

Université de Sherbrooke

Impact de la lipotoxicité sur des cellules de la granulosa de femmes en processus de fécondation *in vitro* et chez des cellules surrénaliennes

Par
Joanie Faubert
Programme de physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en Physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Novembre, 2020

Membres du jury d'évaluation
Pr Jean-Patrice Baillargeon, programme de physiologie
Pr Pedro Geraldès, programme de physiologie
Pr Xavier Roucou, programme de biochimie et de génomique fonctionnelle

© Joanie Faubert, 2020

RÉSUMÉ

Impact de la lipotoxicité sur des cellules de la granulosa de femmes en processus de fécondation *in vitro* et chez des cellules surrénaliennes

Par

Joanie Faubert

Programme de physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en physiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) est un désordre endocrinien répandu chez les femmes en âge de procréer. Il est caractérisé notamment par une dysfonction ovarienne, un risque augmenté de développer une résistance à l'insuline ou un diabète de type 2, ainsi que par l'hyperandrogénie. Notre laboratoire a émis l'hypothèse que la lipotoxicité pourrait expliquer les caractéristiques cliniques, et plus particulièrement la surproduction d'androgènes, des femmes SOPK. Afin de mieux comprendre les mécanismes reliant la lipotoxicité et le SOPK, les objectifs du premier volet de l'étude étaient de comparer entre les femmes ayant des niveaux bas *vs* élevés de lipides dans leur environnement intra-ovarien : les mesures anthropométriques, la production de testostérone et le ratio estradiol/progestérone du liquide folliculaire, l'activation des PKC et des médiateurs de la signalisation de l'insuline dans les cellules de la granulosa, ainsi que les issues de fertilité. Le second volet de l'étude avait comme objectif d'évaluer dans 2 modèles de cellules surrénaliennes humaines l'impact des lipides sur la production d'androgènes, la phosphorylation des médiateurs de l'insuline et l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse. Ainsi, nos résultats n'ont pas démontré de différence entre les femmes ayant peu (< 50^e percentile) *vs* beaucoup (\geq 50^e percentile) de lipides dans leur liquide folliculaire quant aux mesures anthropométriques, aux issues de fertilité et à l'expression des PKC α , ϵ , δ , d'Akt, de JNK et de p38 dans les cellules de la granulosa. Par ailleurs, les femmes avec des niveaux élevés de lipides dans leurs ovaires avaient une production de testostérone augmentée ainsi qu'un ratio estradiol/progestérone supérieur (0,023 [0,014-0,030] *vs* 0,039 [0,026-0,050]. $P = 0,009$). Sous stimulation à la forskolin (Fsk), les cellules humaines de la lignée NCI-H295R exposées à 200 μ M de l'acide gras oléate avaient une production de DHEA augmentée par rapport à celles non exposées (augmentation de $149,1\% \pm 10,3\%$. $P = 0,0007$), ce qui a aussi été obtenu chez des cellules surrénaliennes humaines en culture primaire d'individus de moins de 50 ans. Dans la lignée cellulaire, nous avons également remarqué que les cellules cultivées dans un milieu lipotoxique présentaient une diminution de l'activation de ERK1/2 ($82,5\% \pm 23,8\%$. $P = 0,002$) et une augmentation de l'expression génique des cofacteurs cytochrome b5 et POR de la P450c17. En somme, les résultats de l'étude suggèrent que les AGNE peuvent affecter la production des hormones sexuelles en perturbant la signalisation de la voie d'ERK1/2 et en augmentant l'expression des principaux cofacteurs de la P450c17.

Mots clés : SOPK, AGNE, lipotoxicité, androgènes, PKC, insuline.

TABLE DES MATIERES

Résumé	i
Table des matières	ii
Liste des figures	vi
Liste des tableaux	viii
Liste des abréviations	ix
Remerciements	xi
Introduction.....	1
1.1 Syndrome des ovaires polykystiques.....	2
1.1.1 Caractéristiques cliniques du SOPK.....	2
1.1.2 Causes possibles du SOPK.....	4
1.2 Stéroïdogénèse.....	5
1.2.1 Axe corticotrope et stéroïdogénèse surrénalienne	5
1.2.2 Description de la P450c17 et de sa régulation.....	7
1.2.3 Anatomie de l’ovaire et axe hypothalamo-hypophyso-gonadique	9
1.2.4 Stéroïdogénèse ovarienne	11
1.2.5 Stéroïdes retrouvés dans le liquide folliculaire.....	14
1.3 Fécondation <i>in vitro</i>	15
1.4 Lipotoxicité.....	17
1.4.1 Métabolisme des acides gras non estérifiés	17
1.4.2 Impact des AGNE et de leurs métabolites sur la signalisation cellulaire	19
1.4.3 Lipotoxicité et surproduction d’androgènes	20
1.5 Insuline	22
1.5.1 Signalisation de l’insuline.....	23
1.5.2 Signalisation de l’insuline et lipotoxicité	25
1.5.3 Signalisation de l’insuline et surproduction d’androgènes.....	26
1.6 Protéines kinases C	27
1.6.1 PKC, lipides et signalisation de l’insuline.....	29
1.7 Hypothèses.....	30
1.7.1 Objectifs.....	31
Matériel et méthodes (projet 1).....	33
2.1 Population à l’étude	33
2.1.1 Sélection des participantes.....	33

2.1.2 Recrutement des participantes	34
2.2 Obtention des données cliniques	35
2.2.1 Informations fournies par les patientes	35
2.2.2 Prise des mesures anthropométriques	35
2.2.3 Données cliniques tirées du dossier médical	35
2.3 Récolte des échantillons biologiques	36
2.3.1 Sang	36
2.3.2 Liquide folliculaire et cellules de la granulosa	37
2.4 Analyses protéiques des cellules de la granulosa	37
2.4.1 Décongélation et purification des cellules de la granulosa	37
2.4.2 Séparation des fractions cytosoliques et membranaires	38
2.4.3 Dosage protéique et buvardage de type Western des fractions cytosoliques et membranaires	40
2.4.4 Extraction des protéines totales	41
2.4.5 Dosage protéique et buvardage de type Western des échantillons protéiques totaux	42
2.5 Dosages des échantillons de sang et de liquide folliculaire	44
2.5.1 Dosage des AGNE et des TG	44
2.5.3 Dosage de l'estradiol, de la progestérone et de la testostérone totale	44
2.6 Présentation des résultats	45
2.7 Analyses statistiques	45
Matériel et méthodes (projet 2)	46
3.1 Culture cellulaire	46
3.1.1 NCI-H295R	46
3.1.2 Cellules surrénaliennes humaines	47
3.2 Stimulation cellulaire à la Fsk et à l'oléate	48
3.3 Récolte des cellules	48
3.4 Dosages	49
3.4.1 Dosage du DHEA dans le milieu de culture	49
3.4.2 Dosage protéique	49
3.5 Buvardages de type Western	49
3.6 Analyses de l'expression génique des NCI-H295R	50
3.6.1 Extraction de l'ARNm	50
3.6.2 RT-qPCR	51
3.7 Présentation des résultats	52

3.8 Analyses statistiques	52
Résultats (projet 1).....	53
4.1. Caractéristiques des patientes recrutées.....	53
4.1.2 Mesures anthropométriques et caractéristiques cliniques.....	53
4.1.3 Issues de fertilité	55
4.2 Corrélations entre les niveaux d'AGNE et TG dans le sang et dans le liquide folliculaire.....	56
4.3 Niveaux de testostérone totale, d'estradiol et de progestérone du liquide folliculaire selon sa concentration en lipides	57
4.3.1 Dosage de testostérone totale dans le liquide folliculaire.....	57
4.3.2 Dosages d'estradiol et de progestérone dans le liquide folliculaire	58
4.4 Corrélations entre les dosages effectués dans le liquide folliculaire et les paramètres cliniques des participantes	60
4.5 Niveaux de testostérone totale, d'estradiol et de progestérone du sang selon la concentration en lipides du liquide folliculaire.....	62
4.5.1 Dosage de testostérone totale dans le sang	62
4.5.2 Dosages d'estradiol et de progestérone dans le sang.....	63
4.6 Analyses protéiques des cellules de la granulosa humaines	66
4.6.1 Expression de PKC α , PKC ε et PKC δ dans les fractions cytosoliques et membranaires.....	66
4.6.2 Expression de p-p38, p-JNK et p-Akt dans les extraits de protéines totales de cellules de la granulosa.....	69
4.7 Corrélations entre l'expression des protéines étudiées avec les niveaux de lipides du liquide folliculaire.....	71
Résultats (projet 2).....	73
5.1 Cellules NCI-H295R	73
5.1.1 Effet de 200 μ M d'oléate sur la synthèse de DHEA.....	73
5.1.2 Effet de 200 μ M d'oléate sur l'expression protéique de la P450c17.....	74
5.1.3 Effet de 200 μ M d'oléate sur la phosphorylation de ERK1/2	75
5.1.4 Effet de 200 μ M d'oléate sur l'expression génique des enzymes impliquées dans l'androgénèse surrénalienne	76
5.2 Cellules surrénaliennes humaines.....	77
5.2.1 Effet de 200 μ M d'oléate sur la synthèse de DHEA.....	78
5.2.2 Effet de 200 μ M d'oléate sur l'expression protéique de la P450c17.....	79
5.2.3 Effet de 200 μ M d'oléate sur la phosphorylation de ERK1/2	81
Discussion (projet 1).....	83

6.1 Comparaison des paramètres cliniques selon le niveau de lipides du liquide folliculaire.....	84
6.2 Impact des lipides de l'environnement intra-ovarien sur les issues de fertilité.....	85
6.3 Rôle des lipides sur la stéroïdogénèse	86
6.3.1 Impact sur la production de testostérone	86
6.3.2 Impact sur la synthèse d'estradiol et de progestérone	87
6.4 Impact des lipides du liquide folliculaire sur l'expression et la localisation des PKC des cellules de la granulosa.....	89
6.5 Impact des lipides du liquide folliculaire sur l'expression des protéines impliquées dans la signalisation de l'insuline des cellules de la granulosa	90
6.6 Forces et limites de l'étude actuelle.....	92
Discussion (projet 2).....	94
7.1 Effet de l'oléate sur la production de DHEA.....	94
7.2 Effet de l'oléate sur l'expression de la P450c17, de ses cofacteurs cytochrome b5 et POR ainsi que sur la 3 β -HSD	96
7.3 Effet de l'oléate sur la phosphorylation de ERK1/2	98
Conclusion	99
Perspectives	101
Annexe.....	102
Liste des références.....	108

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schématisation de l'androgénèse de la glande surrénale	7
Figure 2 : Morphologie d'un follicule ovarien	10
Figure 3 : Axe hypothalamo-hypophyso-gonadique et sa régulation par les hormones ovariennes	11
Figure 4 : Schématisation de la stéroïdogénèse des cellules thécales et des cellules de la granulosa.....	13
Figure 5 : Résumé des étapes d'une FIV utilisant un antagoniste de la GnRH comme bloqueur de l'ovulation.....	17
Figure 6 : Signalisation de l'insuline et activation des voies PI3K/Akt et MAPK.....	24
Figure 7 : Corrélations entre les niveaux d'AGNE et de TG séparés dans le sang et dans le liquide folliculaire.....	56
Figure 8 : Corrélation entre les AGNE+TG mesurés dans le sang et dans le liquide folliculaire.....	57
Figure 9 : Niveaux de testostérone totale du liquide folliculaire selon sa concentration de lipides.....	58
Figure 10 : Comparaison des niveaux d'estradiol et de progestérone du liquide folliculaire des 2 groupes de participantes	59
Figure 11 : Ratio estradiol/progestérone du liquide folliculaire selon sa concentration en lipides.....	60
Figure 12 : Comparaison de la testostérone totale sérique entre les 2 groupes de participantes.....	62
Figure 13 : Corrélations entre la testostérone totale dosée dans le sérum et dans le liquide folliculaire.....	63
Figure 14 : Comparaison des niveaux d'estradiol et de progestérone sérique des 2 groupes de patientes	64
Figure 15 : Ratio estradiol/progestérone sérique selon la concentration en lipides dans le sang.....	65
Figure 16 : Corrélation entre les ratios d'estradiol/progestérone sérique et ceux du liquide folliculaire.....	66
Figure 17 : Comparaison de l'expression des PKC α et PKC ϵ dans les fractions cytosoliques et membranaires des cellules de la granulosa humaines des 2 groupes de participantes.....	68
Figure 18 : Comparaison de l'expression de p-p38 dans des extraits de protéines totales de cellules de la granulosa chez les 2 groupes de participantes	69
Figure 19 : Comparaison de l'expression de p-JNK dans des extraits de protéines totales de cellules de la granulosa chez les 2 groupes de participantes	70
Figure 20 : Comparaison de l'expression de p-Akt dans des extraits de protéines totales de cellules de la granulosa chez les 2 groupes de participantes	71
Figure 21 : Effet de 200 μ M d'oléate sur la production de DHEA chez des cellules NCI- H295R traitées à la Fsk.....	73
Figure 22 : Effet de 200 μ M d'oléate sur l'expression de la P450c17 chez des cellules NCI- H295R traitées à la Fsk.....	74

Figure 23 : Effet de 200 μ M d'oléate sur la phosphorylation de ERK1/2 chez des cellules NCI-H295R traitées à la Fsk.....	75
Figure 24 : Effet de 200 μ M d'oléate sur la transcription de CYP17A1 et de HSD3B2 chez des cellules NCI-H295R traitées à la Fsk	76
Figure 25 : Effet de 200 μ M d'oléate sur la transcription de CYB5A et de POR chez des cellules NCI-H295R traitées à la Fsk	77
Figure 26 : Effet de 200 μ M d'oléate sur la production de DHEA chez des cellules surrénaliennes humaines traitées à la Fsk	78
Figure 27 : Effet de 200 μ M d'oléate sur la production de DHEA chez des cellules surrénaliennes humaines traitées à la Fsk et provenant de patients âgés de moins vs plus de 50 ans	79
Figure 28 : Effet de 200 μ M d'oléate sur l'expression de la P450c17 chez des cellules surrénaliennes humaines traitées à la Fsk	80
Figure 29 : Effet de 200 μ M d'oléate sur l'expression de la P450c17 chez des cellules surrénaliennes humaines traitées à la Fsk et provenant de patients âgés de moins vs plus de 50 ans	81
Figure 30 : Effet de 200 μ M d'oléate sur la phosphorylation de ERK1/2 chez des cellules surrénaliennes humaines traitées à la Fsk	82
Figure 31 : Diagramme de points sur l'effet de 200 μ M d'oléate sur la production de DHEA chez des cellules NCI-H295R traitées à la Fsk.....	102
Figure 32 : Diagramme de points représentant l'effet de 200 μ M d'oléate sur l'expression de la P450c17 chez des cellules NCI-H295R traitées à la Fsk	103
Figure 33 : Diagramme de points représentant l'effet de 200 μ M d'oléate sur la phosphorylation de ERK1/2 chez des cellules NCI-H295R traitées à la Fsk.....	103
Figure 34 : Diagramme de points représentant l'effet de 200 μ M d'oléate sur la transcription de CYP17A1 et de HSD3B2 chez des cellules NCI-H295R traitées à la Fsk	104
Figure 35 : Diagramme de points représentant l'effet de 200 μ M d'oléate sur la transcription de CYB5A et de POR chez des cellules NCI-H295R traitées à la Fsk	104
Figure 36 : Diagramme de points représentant l'effet de 200 μ M d'oléate sur la production de DHEA chez des cellules surrénaliennes humaines traitées à la Fsk	105
Figure 37 : Diagramme de points représentant l'effet de 200 μ M d'oléate sur la production de DHEA chez des cellules surrénaliennes humaines traitées à la Fsk et provenant de patients âgés de moins vs plus de 50 ans	105
Figure 38 : Diagramme de points sur l' effet de 200 μ M d'oléate sur l'expression de la P450c17 chez des cellules surrénaliennes humaines traitées à la Fsk	106
Figure 39 : Diagramme de points représentant l'effet de 200 μ M d'oléate sur l'expression de la P450c17 chez des cellules surrénaliennes humaines traitées à la Fsk et provenant de patients âgés de moins vs plus de 50 ans	106
Figure 40 : Diagramme de points représentant l'effet de 200 μ M d'oléate sur la phosphorylation de ERK1/2 chez des cellules surrénaliennes humaines traitées à la Fsk	107

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Définitions du SOPK selon différentes sociétés médicales	2
Tableau 2 : Critères d'inclusion et d'exclusion des participantes recrutées	34
Tableau 3 : Informations tirées du dossier médical des participantes	36
Tableau 4 : Composition des tampons d'extraction utilisés pour séparer les fractions cytosoliques et membranaires des cellules de la granulosa	39
Tableau 5 : Composition des gels de polyacrylamides utilisés pour les buvardages de type Western	40
Tableau 6 : Composition du tampon RIPA utilisé pour la lyse cellulaire	42
Tableau 7 : Récapitulatif des conditions et anticorps primaires utilisés pour les buvardages de type Western du projet 1	43
Tableau 8 : Anticorps secondaires utilisés pour les buvardages de type Western du projet 1	44
Tableau 9 : Limites de détection des dosages ELISA d'estradiol, de progestérone et de testostérone totale	45
Tableau 10 : Récapitulatif des conditions et anticorps utilisés pour les buvardages de type Western du projet 2.....	50
Tableau 11 : Séquences forward et reverse des amorces utilisées pour le qPCR chez les cellules NCI-H295R	51
Tableau 12 : Comparaison des mesures anthropométriques et des caractéristiques cliniques des patientes recrutées	54
Tableau 13 : Comparaison des issues de fertilité des patientes recrutées.....	55
Tableau 14 : Corrélations entre les AGNE+TG, le ratio estradiol/progestérone du liquide folliculaire et les paramètres cliniques des participantes.....	61
Tableau 15 : Corrélations entre l'expression des protéines analysées et les niveaux d'AGNE+TG du liquide folliculaire.....	72

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3 β -HSD	3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
ACTH	Hormone corticotrope
AGNE	Acides gras non estérifiés
AMH	Anti-Mullerian hormone
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
CRH	Corticolibérine
DAG	Diglycéride
DHEA	Déhydroépiandrosterone
DHT	Dihydrotestostérone
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FIV	Fécondation <i>in vitro</i>
FSH	Hormone folliculo-stimulante
Fsk	Forskolin
G6P	Glucose-6-phosphate
GnRH	Gonadolibérine
HMG-CoA réductase	Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase
ICSI	Injection intracytoplasmique de spermatozoïdes
IMC	Indice de masse corporelle
IRS	Insulin receptor substrate
JNK	Kinase c-Jun N-terminal
LDL	Lipoprotéine de basse densité
LH	Hormone lutéinisante
LHS	Lipase hormosensible
LPL	Lipoprotéine lipase
MC2	Récepteur de la mélanocortine 2
MII	Métaphase II
O/N	Overnight
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinases
PKA	Protéine kinase A
POR	P450oxydoréductase
PP2A	Protéine phosphatase 2
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PKC	Protéine kinase C
RAMQ	Régie de l'assurance maladie du Québec
ROS	Espèces réactives de l'oxygène

SHBG	Globuline liant les hormones sexuelles
shRNA	Petit ARN en épingle à cheveux
SOPK	Syndrome des ovaires polykystiques
StAR	Protéine régulatrice du transport intra-mitochondrial du cholestérol
TG	Triglycérides
TLR	Toll-like receptors
TP	Température pièce
TSPO	Peripheral-type benzodiazepine receptor
VLDL	Very-low-density lipoproteins

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Pr Jean-Patrice Baillargeon, pour tout l'encadrement qu'il m'a fourni depuis le début de mes stages de baccalauréat jusqu'à la maîtrise. Sa passion pour la science et son sens de la pédagogie hors pair m'ont permis d'acquérir plusieurs aptitudes qui me seront assurément utiles dans ma carrière. Je veux également remercier les Prs Pedro Geraldès et Xavier Roucou pour leurs nombreux conseils tout au long de ma maîtrise et pour avoir pris le temps de réviser ce mémoire.

De plus, je souhaite remercier tous les étudiants que j'ai côtoyés dans le bureau 3974. Nos dîners et les moments passés ensemble dans les laboratoires ont égayés mes journées et font partis des bons souvenirs que je garde de mon passage à l'UdeS.

Sur une note un peu plus personnelle, je remercie mes parents et mes grands-parents pour leur support incroyable et leurs encouragements au cours des dernières années. Un merci spécial à mon grand-père George pour m'avoir transmis son amour de la science et de la médecine dès mon jeune âge. Finalement, je remercie mon amoureux, William, pour son soutien inconditionnel et pour m'encourager jour après jour à poursuivre mes rêves.

INTRODUCTION

Le contenu de ce mémoire portera sur l'impact de la lipotoxicité intra-ovarienne et surrénalienne dans l'hyperandrogénisme caractérisant les femmes atteintes du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK), puisque notre laboratoire a émis l'hypothèse que cette lipotoxicité pourrait jouer un rôle de premier plan dans la surproduction d'androgènes et la diminution de la fertilité de ces patientes.

Afin de mieux comprendre les mécanismes derrière les dérèglements de la stéroïdogénèse, 2 projets de recherche distincts seront présentés dans ce texte. Le premier portera sur la comparaison des paramètres anthropométriques, de la production hormonale ainsi que de la signalisation cellulaire de femmes en processus de fécondation *in vitro* (FIV) ayant des niveaux bas vs élevés de lipides dans leur environnement intra-ovarien, soit leur liquide folliculaire. Le second projet s'intéressera quant à lui à l'effet des lipides sur la production d'androgènes et sur la signalisation de l'insuline dans des modèles *in vitro*, soit la lignée cellulaire NCI-H295R ainsi que des cellules surrénaliennes humaines en culture primaire.

Avant de présenter les résultats obtenus dans le cadre de ces 2 projets de recherche, une introduction détaillera les concepts clés derrière mon sujet de maîtrise. De plus, les méthodes employées pour répondre aux objectifs seront expliquées et les résultats seront discutés suite à leur présentation dans la section prévue à cet effet. Ce mémoire se terminera par une conclusion ainsi que des perspectives générales qui pourront être explorées lors de prochaines études.

1.1 Syndrome des ovaires polykystiques

1.1.1 Caractéristiques cliniques du SOPK

Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) est un problème d'ordre endocrinien qui a été décrit dans la littérature pour la première fois par des médecins américains en 1935 (Stein *et al.* 1935). Depuis, ce sujet a attiré l'attention de nombreux chercheurs qui ont voulu comprendre la pathophysiologie derrière ce syndrome et qui ont tenté d'établir des critères diagnostiques uniformes au sein de la communauté médicale. Parmi les plus utilisés, nous retrouvons les critères du *National Institutes of Health* (NIH), ceux de Rotterdam ainsi que les critères de l'*Androgen Excess and PCOS Society* (AE-PCOS) présentés dans le tableau ci-dessous (Bulent Okan Yildiz *et al.* 2012). À noter que ces 3 définitions requièrent l'exclusion de diagnostics pouvant causer des signes ou symptômes semblables au SOPK.

Tableau 1 : Définitions du SOPK selon différentes sociétés médicales

Société	Année de publication	Définition du SOPK
NIH	1990	Présence des critères suivants : <ul style="list-style-type: none">- Hyperandrogénie clinique ou biochimique- Anovulation chronique
Rotterdam	2004	Présence de 2 des critères suivants : <ul style="list-style-type: none">- Hyperandrogénie clinique ou biochimique- Oligo-anovulation chronique- Ovaires polykystiques visualisés à l'échographie
AE-PCOS	2006	Présence d'hyperandrogénie clinique ou biochimique associée à un des critères suivants : <ul style="list-style-type: none">- Oligo-anovulation chronique- Ovaires polykystiques visualisés à l'échographie

Ces différents critères peuvent entraîner de la confusion chez les scientifiques, puisque leur utilisation varie d'un pays à l'autre. Cela peut être problématique lorsque vient le temps

d'évaluer entre-autre la prévalence du SOPK, puisque celle-ci tend à changer selon les définitions utilisées. En fait, en étudiant la même population majoritairement caucasienne, la prévalence varie entre 6,1% (NIH), 15,3% (AE-PCOS) et 19,9% (Rotterdam) (Yildiz *et al.* 2012).

La lecture des différentes définitions du SOPK peut nous renseigner sur les principales caractéristiques cliniques de ce syndrome. En fait, l'hyperandrogénisme est le critère le plus répandu et peut se présenter sous la forme clinique ou biochimique. L'hyperandrogénie clinique comprend différentes manifestations, telles l'hirsutisme, l'acné, l'alopécie ou la dermite séborrhéique (Escobar-Morreale 2018). L'étiologie biochimique est habituellement diagnostiquée lorsque les niveaux de testostérone libre sont augmentés. Puisqu'il a été démontré que le dosage d'autres androgènes comme l'androstènedione ou le DHEAS était peu utile étant donné qu'un nombre restreint de femmes avaient des niveaux de testostérone libre normaux tout en ayant une augmentation de ces androgènes, ceux-ci ne sont pas toujours dosés lorsque vient le moment d'établir un diagnostic (Escobar-Morreale 2018). Par ailleurs, il est intéressant de savoir que l'hyperandrogénie chez les femmes SOPK provient de 2 organes producteurs d'androgènes, soit la glande surrénale qui est responsable de 40% de l'hyperproduction, et de l'ovaire qui produit le 60% restant (Cedars *et al.* 1992). De ce fait, il est pertinent d'étudier ces 2 environnements dans des projets de recherche lorsqu'on s'intéresse à l'augmentation des androgènes circulants chez les patientes atteintes du SOPK. Les particularités de la stéroïdogénèse dans ces organes seront discutées dans les sections suivantes.

Le SOPK peut également être associé avec des troubles au niveau de la fonction reproductrice. En fait, en plus d'avoir une prévalence augmentée d'aménorrhée dans cette population, ce syndrome est la cause principale d'infertilité anovulatoire chez les femmes en âge de procréer (Escobar-Morreale 2018; McCartney *et al.* 2016). Par ailleurs, cette dysfonction ovulatoire rend les patientes plus à risque de développer une hyperplasie endométriale ainsi qu'un carcinome de l'endomètre à long-terme (Azziz *et al.* 2009).

Une autre caractéristique importante associée au SOPK est le risque augmenté de développer une résistance à l'insuline ou un diabète de type 2 (Ben-Haroush *et al.* 2004). Par contre, la prévalence de résistance à l'insuline varie de manière importante selon le phénotype du SOPK. Il semble que cette dysfonction métabolique soit plus présente chez les femmes ayant le syndrome classique (selon les critères du NIH ou AE-PCOS) en comparaison avec celles présentant un phénotype normoandrogénique (Moggetti *et al.* 2013). Un élément pouvant aggraver la résistance à l'insuline ou les autres manifestations du SOPK est la présence d'obésité chez les patientes, qui est présente chez beaucoup d'entre-elles. En effet, aux États-Unis, une étude a révélé que plus de 50% des femmes SOPK étaient en surpoids ou obèses au moment de leur diagnostic (Yildiz *et al.* 2008). En plus des problèmes métaboliques causés par l'obésité tels la résistance à l'insuline, le diabète de type 2 ou la dyslipidémie, il a été démontré que les patientes SOPK obèses présentaient davantage d'hirsutisme, de troubles menstruels et d'anovulation que les femmes SOPK ayant un poids normal (Diamanti-Kandarakis 2007). De manière intéressante, celles qui perdent du poids parviennent à diminuer leurs troubles menstruels et à augmenter la fréquence de leur ovulation, ce qui serait causé par la baisse des niveaux circulants des androgènes DHEAS, androstènedione et testostérone (Martínez-Bermejo *et al.* 2007).

1.1.2 Causes possibles du SOPK

Depuis la première description du syndrome, plusieurs hypothèses ont été mises de l'avant afin d'expliquer les mécanismes menant au développement du SOPK. Tout d'abord, puisque cette condition peut être associée à une augmentation de la relâche de l'hormone gonadolibérine (GnRH) provenant de l'hypothalamus, il a été proposé que cette dysfonction causerait une augmentation de l'hormone lutéinisante (LH) et une diminution de l'hormone folliculo-stimulante (FSH), ce qui serait responsable de l'hyperandrogénisme et des troubles ovulatoires (Stein *et al.* 1935; McCartney *et al.* 2016). Par contre, plusieurs femmes avec le SOPK ne présentent pas d'augmentation du ratio LH sur FSH, surtout les femmes obèses (Al-Jefout *et al.* 2017). D'autres chercheurs ont plutôt avancé la théorie que ce serait directement la résistance à l'insuline des femmes SOPK qui serait à la base du développement de cette pathologie, à cause d'un défaut au niveau de la phosphorylation du

récepteur de l'insuline dans les cellules musculaires et le tissu adipeux (Bednarska *et al.* 2017). Par contre, comme discuté plus tôt, ce ne sont pas toutes les femmes SOPK qui développent de la résistance à l'insuline, et vice-versa, de sorte qu'il est peu probable que ce soit le facteur principal causant la survenue de cette condition. De plus, certains auteurs ont évoqué la possible implication de plusieurs gènes dans le développement du SOPK, tels ceux codant pour des récepteurs aux gonadotropines, FSH- β et le récepteur à l'insuline (McCartney *et al.* 2016).

Notre laboratoire a également proposé une hypothèse concernant les facteurs impliqués dans le SOPK. Nous sommes d'avis que ce serait plutôt la lipotoxicité, soit la somme des conséquences cellulaires toxiques résultant d'une surexposition ou d'un excès d'effet des AGNE au niveau des tissus non-adipeux qui serait responsable des caractéristiques cliniques de cette dysfonction endocrinienne. Cette théorie s'appuie sur les résultats de nombreuses études qui démontrent entre autre que la production d'androgènes est augmentée suite à une hausse des niveaux de lipides circulants et de la lipotoxicité (Mai *et al.* 2006, 2008). La lipotoxicité ainsi que ses impacts sur la production d'androgènes et la signalisation de l'insuline seront abordés plus en détail dans les sections suivantes.

1.2 Stéroïdogénèse

Afin de mieux comprendre les mécanismes pouvant influencer la production des différents stéroïdes impliqués dans mon projet de maîtrise, un survol des étapes importantes de la stéroïdogénèse de la glande surrénale et de l'ovaire sera faite dans cette présente section.

1.2.1 Axe corticotrope et stéroïdogénèse surrénalienne

La glande surrénale est constituée d'une partie interne, la médulla, ainsi que d'une partie externe, soit le cortex. La médulla est responsable de la production de catécholamines tandis que le cortex, qu'on peut diviser en 3 couches, synthétise les minéralocorticoïdes (zone glomérulée), les glucocorticoïdes (zone fasciculée) et les androgènes (zone réticulée et

fasciculée) (Gallo-Payet *et al.* 2014). Pour les besoins de ce mémoire, seule la production d'androgènes induite par l'ACTH sera abordée dans le texte.

Tout d'abord, l'axe corticotrope débute par la relâche de corticolibérine (CRH) par l'hypothalamus dans le système porte hypothalamo-hypophysaire, ce qui mènera à la sécrétion de l'hormone corticotrope (ACTH) par les cellules de l'adénohypophyse. Cette dernière se produit de manière pulsatile et suit un rythme circadien, de sorte que les niveaux d'ACTH varient au cours de la journée (Spiga *et al.* 2011). Suite à la relâche d'ACTH dans la circulation systémique, cette hormone ira se lier à son récepteur MC2, qui fait partie de la famille des récepteurs de la mélanocortine, qui sont couplés aux protéines G et agissent par l'intermédiaire de l'AMPc (Gallo-Payet 2016). La liaison de l'ACTH et l'activation subséquente de la protéine kinase A (PKA) sont responsables de la mobilisation du cholestérol à partir des gouttelettes lipidiques (Gallo-Payet 2016). Ce cholestérol peut provenir de 2 sources distinctes, c'est-à-dire qu'il peut être synthétisé de manière endogène par l'enzyme hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (HMG-CoA réductase) ou être livré par l'intermédiaire des lipoprotéines LDL (Baptiste *et al.* 2010). Le cholestérol est ensuite transféré de la membrane mitochondriale externe vers la membrane mitochondriale interne via l'action de la protéine régulatrice du transport intra-mitochondrial du cholestérol (StAR), ce qui est considéré comme étant l'étape limitante de la stéroïdogenèse (Stocco 2000). Celle-ci fait partie d'un complexe avec la protéine translocatrice *peripheral-type benzodiazepine receptor* (TSPO), de sorte que les 2 composantes sont cruciales pour la production d'androgènes de la part des cellules réticulées et fasciculées (Rone *et al.* 2009). Une fois à l'intérieur de la mitochondrie, la P450_{scc} pourra convertir le cholestérol en pregnénolone, qui sera par la suite redirigé vers le réticulum endoplasmique afin d'être transformé par différentes enzymes, tel que schématisé à la figure 1. À noter que les glandes surrénales produisent principalement du DHEA et du DHEAS, puisque l'enzyme 3 β -HSD est peu exprimée dans la zone réticulée (Nakamura *et al.* 2011). Par ailleurs, ces androgènes formés par les surrénales n'exercent pas de rétroaction négative sur la relâche de l'ACTH par l'hypothalamus, contrairement au cortisol, de sorte que leurs niveaux sont peu régulés (Baptiste *et al.* 2010).

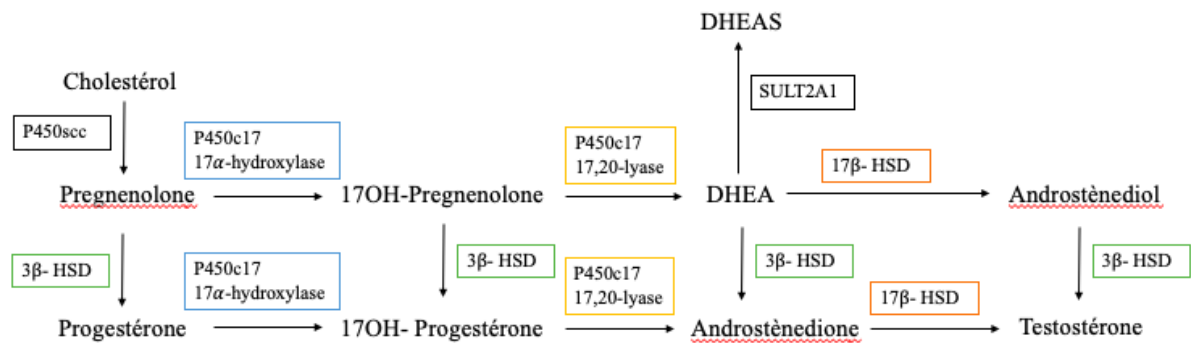


Figure 1 : Schématisation de l'androgénèse de la glande surrénale

Le cholestérol est transféré à l'intérieur de la mitochondrie par la protéine StAR pour y être ensuite transformé en pregnénolone. Ce précurseur est transporté vers le réticulum endoplasmique afin de former les stéroïdes présentés dans le schéma. Adapté de Baptiste *et al.* 2010.

1.2.2 Description de la P450c17 et de sa régulation

La protéine P450c17, codée par le gène CYP17A1, joue un rôle central dans la production d'androgènes. Celle-ci possède 2 activités qui vont permettre de guider la stéroïdogénèse, soit la 17 α -hydroxylase et la 17,20-lyase. La première permet la transformation de la pregnénolone en 17OH-pregnenolone et de la progestérone en 17OH-progestérone, respectivement. Une forte expression de cette activité 17 α -hydroxylase favorise la production de corticostéroïdes, comme c'est le cas dans la zone fasciculée du cortex surrénalien (Ishimura *et al.* 1997). L'activité 17,20-lyase de la P450c17 est quant à elle fortement exprimée dans la zone réticulée, ce qui en fait la couche principale de production de DHEA et d'androstènedione dans la surrénale et se charge de la transformation de la 17OH-pregnenolone en DHEA et de la 17OH-progestérone en androstènedione. Comme il en sera question dans la section 1.2.4, les 2 activités de cette protéine sont également exprimées dans les cellules thécales de l'ovaire afin d'y permettre la production d'androgènes. Par ailleurs, la régulation de l'activité de la P450c17 se fait principalement via la modulation de la 17,20-lyase par 3 facteurs qui seront discutés dans cette section : la

P450 oxydoréductase (POR), le cytochrome b5 et la phosphorylation en sérine/thréonine de la P450c17.

L'augmentation de l'activité 17,20-lyase se fait suite au transfert par la P450oxydoréductase (POR) de 2 électrons sur la P450c17. La protéine POR, présente au niveau du réticulum endoplasmique, contient un domaine lié à la flavine adénine dinucléotide (FAD) qui est séparé d'un domaine lié à la flavine mononucléotide (FMN) par une région charnière flexible (Miller *et al.* 2014). Le domaine FAD peut recevoir 2 électrons issus de la réduction du NADPH en NADP^+ , ce qui résulte en un changement conformationnel de la région charnière de POR. Ceci permet le rapprochement des domaines FAD et FMN, de sorte que les électrons sont transférés vers cette dernière partie de la protéine. Ensuite, POR reprend sa conformation initiale, ce qui permet l'interaction du domaine FMN avec la P450c17 afin de transférer les 2 électrons vers son groupement hème, ce qui provoquera la séparation du complexe POR-P450c17 et son activation (Miller *et al.* 2014).

Le cytochrome b5 a également un rôle à jouer dans la régulation de l'activité 17,20-lyase de la P450c17. Tout comme POR, il est présent dans les glandes surrénales et dans les gonades afin d'augmenter l'activité 17,20-lyase et la production d'androgènes. Ce cytochrome est responsable de faciliter l'interaction entre la protéine POR et la P450c17 pour que les 2 électrons puissent être transférés (Miller *et al.* 2014). L'absence du cytochrome b5 peut avoir des conséquences importantes sur l'androgénèse. En fait, il a été prouvé que des mutations du cytochrome b5 pouvaient entraîner une diminution de l'activité 17,20-lyase chez l'humain (Giordano *et al.* 1994).

Le dernier facteur pouvant influencer l'activité 17,20-lyase de la P450c17 est sa phosphorylation en sérine/thréonine. Peu d'éléments sont connus sur les kinases impliquées dans la phosphorylation de cette protéine, outre le fait que ce serait des kinases dépendantes de l'AMPc (Miller *et al.* 2014). Comme le cytochrome b5, la phosphorylation en sérine/thréonine augmente l'activité 17,20-lyase en favorisant l'interaction entre POR et la P450c17. Ces 2 facteurs modulant l'interaction entre POR et la P450c17 agissent

indépendamment l'un de l'autre et leur impact n'est pas additif, comme il a été démontré dans une étude publiée en 2005 (Pandey *et al.* 2005).

1.2.3 Anatomie de l'ovaire et axe hypothalamo-hypophyso-gonadique

Le second organe producteur d'hormones important pour mon projet de maîtrise est l'ovaire. Ce dernier possède également une médulla en son centre, qui contient les vaisseaux sanguins ovariens, ainsi qu'un cortex au niveau de la partie externe de l'ovaire où l'on retrouve les follicules (White *et al.* 2019). Ceux-ci sont d'une grande importance, puisqu'ils possèdent des fonctions reproductrices et endocriniennes, comme il en sera question à la section 1.2.4. Les follicules ovariens matures sont formés de plusieurs types cellulaires qui ont des rôles bien distincts. Autour de ceux-ci, on retrouve les cellules thécales dérivées des cellules stromales ovariennes, qui sont responsables de la production d'androgènes et expriment les mêmes enzymes que les cellules réticulées de la glande surrénales. Les follicules contiennent aussi plusieurs couches de cellules de la granulosa qui entourent l'ovocyte et forment avec celui-ci le complexe cumulus-ovocyte. Les rôles de ces cellules sont de produire des estrogènes à partir des androgènes synthétisés par les cellules thécales et aussi de former le corps jaune suite à l'ovulation, tel qu'expliqué ci-dessous (Williams *et al.* 2000). Au centre des follicules ovariens, on retrouve un milieu nommé liquide folliculaire, qui contient toutes les hormones sécrétées par les cellules stéroïdogènes qui sont nécessaires au bon développement de l'ovocyte.

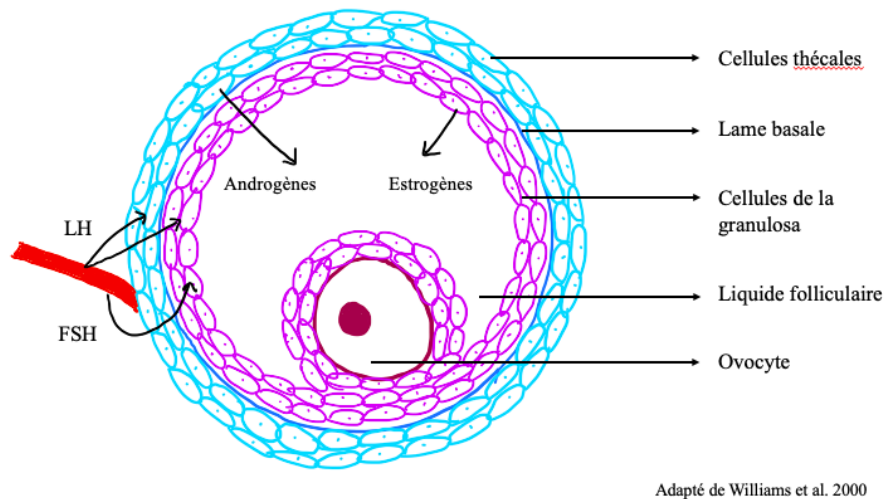


Figure 2 : Morphologie d'un follicule ovarien

Les follicules présents dans le cortex ovarien sont composés des cellules thécales productrices d'androgènes, des cellules de la granulosa qui synthétisent les estrogènes, du liquide folliculaire ainsi que de l'ovocyte qui sera expulsé lors de l'ovulation. Ces différents types cellulaires produisent ces hormones sous l'action de la LH et de la FSH relâchées par l'adénohypophyse.

Afin de mieux saisir les médiateurs impliqués dans la production des stéroïdes dans l'ovaire, un rappel de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique sera fait dans les prochains paragraphes.

Sécrétée par l'hypothalamus, la GnRH est responsable de la régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique en induisant la sécrétion de LH et de FSH par les cellules gonadotropes de l'adénohypophyse. Cette modulation se fait entre autre à cause du caractère pulsatile de la sécrétion de GnRH. En fait, elle stimule la relâche de LH par des pulses rapides, tandis que la FSH est favorisée par des pulses avec des longs intervalles (White *et al.* 2019). La sécrétion de LH et de FSH mènera à la synthèse de la progestérone, des androgènes et des estrogènes par les cellules ovariennes et ces hormones pourront par la suite réguler les niveaux de GnRH, LH et de FSH, comme il en sera question ci-dessous lors de la discussion sur le cycle menstruel.

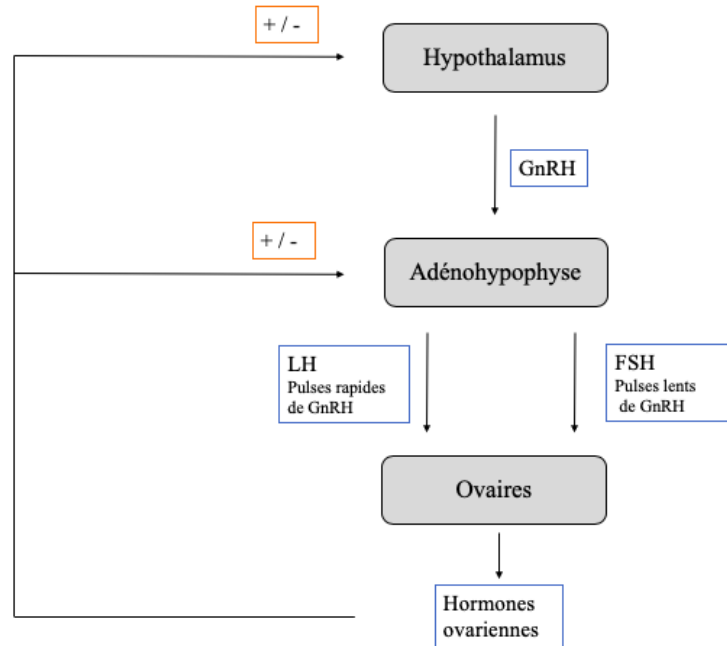


Figure 3 : Axe hypothalamo-hypophyso-gonadique et sa régulation par les hormones ovariennes

La production d'hormones ovariennes (progestérone, androgènes et estrogènes) débute par la relâche de GnRH de l'hypothalamus dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Elle induira la relâche de LH et de FSH par l'adénohypophyse, qui iront stimuler les cellules thécales et de la granulosa de l'ovaire à produire les hormones décrites plus haut. Selon leur concentration dans la circulation systémique, la progestérone et les estrogènes seront ensuite en mesure de réguler positivement ou négativement la sécrétion de GnRH, LH et FSH.

Adapté de White *et al.* 2019.

1.2.4 Stéroïdogénèse ovarienne

Les interactions entre les différentes hormones présentes dans l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique sont bien illustrées dans le cycle menstruel de la femme en âge de procréer. Tout d'abord, lorsqu'il n'y a pas de fécondation, ce cycle débute avec la régression du corps jaune, dont la formation sera expliqué ci-après, par l'absence de sécrétion de β -hCG de la part de l'ovule fécondé (White *et al.* 2019). La β -hCG est un analogue de la LH et permet la survie du corps jaune en cas de fécondation. Cette régression entrainera la diminution des niveaux de progestérone, d'estradiol et d'inhibine A, un répresseur de la FSH. Ce retrait de l'inhibition augmentera la sécrétion de FSH afin de recruter des follicules qui

pourront croître sous l'action des gonadotropines. À ce moment, les follicules commencent à sécréter de petites quantités d'estrogènes, ce qui exerce une rétroaction négative sur la FSH de l'adénohypophyse. La diminution des taux sanguins de FSH cause l'atrésie, donc l'apoptose, des follicules recrutés, en épargnant celui qui possède le meilleur apport sanguin et le plus grand nombre de récepteurs à la FSH (White *et al.* 2019). Ce sera le follicule dominant du cycle qui produira des quantités importantes d'estrogènes. Aussi, à ce moment du cycle, la FSH permet d'induire l'expression des récepteurs à la LH dans les cellules de la granulosa de ce follicule.

La grande concentration d'estrogènes présente durant environ 2 jours causera une rétroaction positive sur l'adénohypophyse, ce qui provoquera le pic de LH nécessaire à l'ovulation. Il permet ainsi à l'ovule de compléter la méiose I et de s'arrêter en métaphase II (MII) ainsi que la formation du bris de la paroi du follicule pour que l'ovule puisse être relâché vers la trompe de Fallope (White *et al.* 2019).

Après l'ovulation, les cellules de la granulosa deviennent un corps jaune qui sert à produire de grandes quantités de progestérone ainsi que de petites quantités d'estrogènes, ce qui est essentiel pour permettre le maintien d'une grossesse jusqu'à ce que le placenta soit en mesure de produire à son tour de la progestérone (White *et al.* 2019). Les hormones ovariennes sécrétées par le corps jaune font ensuite une rétroaction négative sur les niveaux de GnRH, LH et de FSH. Puisque les gonadotrophines redeviennent à un niveau basal, le corps jaune finira par régresser, à moins qu'il soit maintenu par la β -hCG. Le cycle recommence alors avec la sécrétion de FSH par l'adénohypophyse.

Comme mentionné, les principales hormones produites par l'ovaire sont la progestérone, les androgènes ainsi que les estrogènes. Les cellules thécales productrices d'androgènes et les cellules de la granulosa qui synthétisent majoritairement les estrogènes sont influencées par la LH et la FSH relâchées par l'adénohypophyse. En fait, tel que schématisé à la figure 4, la LH permet aux cellules thécales d'induire l'expression du récepteur à LDL afin de capter le cholestérol et aussi d'augmenter l'expression des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse, notamment les 2 activités de la P450c17, comme il en a été question avec les

cellules réticulées. Contrairement aux cellules surrénaliennes, elles produisent principalement de l'androstènedione et un peu de testostérone (White *et al.* 2019). Chez les femmes, ces androgènes ne sont pas impliqués dans la régulation négative des gonadotropines, de sorte que leur concentration peut atteindre des niveaux importants en cas de dysfonction de l'androgénèse (Baptiste *et al.* 2010).

L'androstènedione (et faiblement la testostérone) produites par les cellules thécales peuvent diffuser vers les cellules de la granulosa adjacentes, où ils seront transformés en estrogènes sous l'action de l'aromatase. L'expression génique de l'aromatase ainsi que son activité enzymatique est induite par la liaison de la FSH à son récepteur sur les cellules de la granulosa (White *et al.* 2019). Puisque ce type cellulaire n'exprime pas la P450c17, la production d'androgènes par les cellules thécales est nécessaire afin que les cellules de la granulosa puissent synthétiser des estrogènes (Hannon *et al.* 2015). Par ailleurs, dans les cellules de la granulosa du follicule dominant, la FSH permet d'induire l'expression du récepteur à la LH afin qu'elles puissent répondre au pic de LH. Ceci permettra également l'inhibition de l'expression de l'aromatase suite à l'ovulation et la production de progestérone par le corps jaune (White *et al.* 2019).

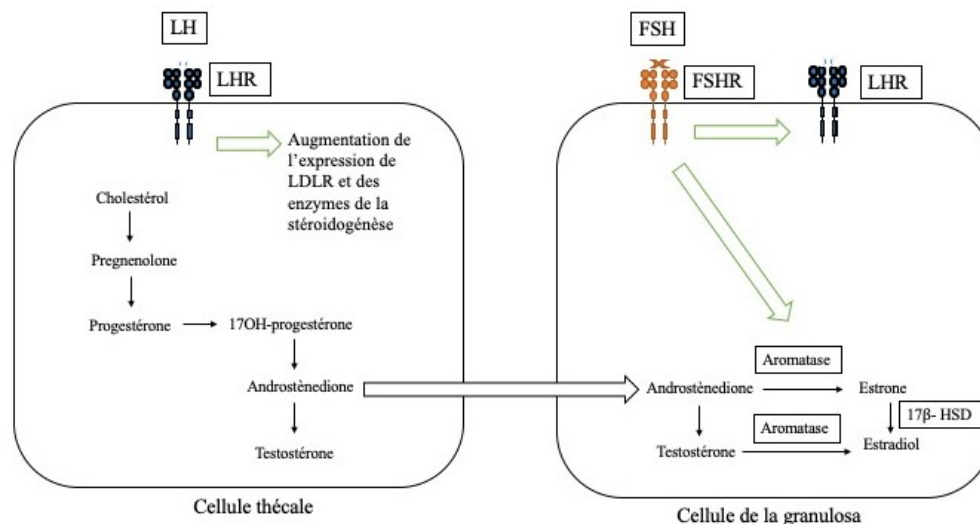


Figure 4 : Schématisation de la stéroïdogénèse des cellules thécales et des cellules de la granulosa

La liaison de la LH à son récepteur sur les cellules thécales provoque l'augmentation de l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse ainsi que du récepteur à LDL afin de

promouvoir la captation du cholestérol. Les androgènes produits diffusent vers les cellules de la granulosa adjacentes afin d'être transformés en estrogènes sous l'action de l'aromatase, dont l'expression est induite par la FSH. Les cellules de la granulosa du follicule dominant expriment aussi le récepteur à la LH pour produire la progestérone suite à l'ovulation. Informations tirées de White *et al.* 2019.

1.2.5 Stéroïdes retrouvés dans le liquide folliculaire

Les différentes hormones relâchées par les cellules ovariennes peuvent être retrouvées dans le milieu autour du follicule, soit le liquide folliculaire. Il s'agit d'un produit de filtration qui se forme suite au passage du sang à travers la barrière formée par le follicule et qui contient les stéroïdes produits par les cellules thécales et les cellules de la granulosa (Revelli *et al.* 2009). Sa composition est donc importante pour le bon développement du follicule et son analyse peut nous renseigner sur le micro-environnement retrouvé dans l'ovaire.

En fait, plusieurs hormones produites par les cellules ovariennes peuvent être mesurées dans le liquide folliculaire afin d'évaluer le bon fonctionnement des cellules thécales et des cellules de la granulosa. Par contre, puisque le prélèvement de ce liquide est invasif et requiert une ponction d'ovules faite sous la supervision d'un médecin gynécologue, cette procédure est principalement faite dans le cadre d'une fécondation *in vitro* (FIV). Cette intervention sera expliquée dans la section 1.3.

Si le liquide folliculaire est récupéré, il est possible d'y doser entre autres la progestérone, les estrogènes et les androgènes. Il est connu que les niveaux élevés d'estradiol dans le liquide folliculaire sont associés à une bonne croissance des cellules contenues dans le follicule et qu'ils promeuvent la maturation cytoplasmique de l'ovocyte (Tesarik *et al.* 1997; Revelli *et al.* 2009). Au contraire, des hauts taux de progestérone ont, de leur côté, été associés à des ovocytes dont la fécondation s'est déroulée de façon anormale (Ben-Rafael *et al.* 1987). Dans un même ordre d'idée, le ratio estradiol/progestérone mesuré dans le liquide folliculaire peut être utilisé comme marqueur de qualité du follicule. En effet, il a été démontré dans de nombreuses études qu'un ratio estradiol/progestérone élevé serait lié à une meilleure maturation de l'ovocyte et à des issues de fertilité plus favorables (Tarlitzis *et al.*

1985; Ben-Rafael *et al.* 1987; Eyvaznejad *et al.* 2018). Par contre, quelques résultats contradictoires sur ce sujet ont été publiés dans la littérature, de sorte qu'il existe probablement un niveau à partir duquel la progestérone a des effets néfastes sur l'ovocyte, mais ceci n'a pas été démontré jusqu'à présent (Revelli *et al.* 2009). Comme mentionné, les androgènes peuvent également être dosés dans le liquide folliculaire. Il est connu que des niveaux importants de testostérone dans le liquide folliculaire peuvent être associés au développement d'ovocytes et d'embryons de moins bonne qualité (Uehara *et al.* 1985). Par ailleurs, il a été décrit qu'un haut ratio entre les mesures de testostérone et d'estradiol est lié à davantage d'atrésie et de dysfonction chez les cellules de la granulosa (Costa *et al.* 2004). Finalement, d'autres études ont également démontré que le ratio estradiol/testostérone était plus élevé dans les follicules qui allaient parvenir à produire une grossesse (Andersen 1993).

1.3 Fécondation *in vitro*

La section précédente a permis de mettre en relief les concepts physiologiques importants que l'on retrouve dans la fécondation *in vitro*. Les étapes de cette procédure de procréation médicalement assistée seront expliquées ci-dessous afin de mieux comprendre dans quel contexte sont recrutées les participantes pour ma maîtrise et également pour mieux saisir les impacts potentiels de la FIV sur les résultats obtenus dans le cadre de ce projet. À noter que plusieurs protocoles différents peuvent être réalisés dans les cliniques de fertilité, mais puisque celui qui requiert l'administration d'un antagoniste de la GnRH est le plus utilisé au Québec, seul ce dernier sera détaillé dans ce mémoire.

Tout d'abord, le protocole de FIV débute par une hyperstimulation ovarienne qui survient suite à l'injection quotidienne d'analogues de la FSH et de la LH. Ceci a pour but d'induire un cycle hormonal artificiel et de recruter plusieurs follicules en vue de la ponction d'ovules. À ce stade, des échographies transvaginales ainsi que des dosages sanguins d'estradiol et de progestérone sont effectués plusieurs fois par semaine afin d'évaluer le nombre et la croissance des follicules. Cette étape dure environ 8 jours, mais elle peut varier selon le recrutement et la maturation folliculaire (Maldonado *et al.* 2013).

La seconde étape est l'ajout d'un antagoniste de la GnRH, le Cetrotide®, aux autres injections quotidiennes lorsque les follicules atteignent un diamètre moyen supérieur à 14 mm à l'échographie (Maldonado *et al.* 2013). Ce médicament est important afin d'empêcher la survenue du pic de LH et de l'ovulation qui pourrait se produire, étant donné les niveaux élevés d'estradiol sanguins. Une ovulation précoce empêcherait la récolte des ovocytes et la réalisation de la FIV.

Environ 12 jours après le début du protocole ou lorsqu'au moins 3 follicules ont un diamètre supérieur à 17 mm, leur maturation finale est déclenchée par une injection de hCG, un analogue de la LH (Maldonado *et al.* 2013). Les ovules seront ponctionnés 36 h plus tard par voie transvaginale sous la supervision d'un gynécologue-obstétricien.

Après la ponction d'ovules, l'embryologiste retire les cellules de la granulosa qui entourent les ovules et évalue leur stade de maturation ainsi que leur morphologie. À ce stade, la FIV peut se faire de 2 manières : par mise en contact de l'ovule avec les spermatozoïdes ou par l'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI). La fécondation est habituellement confirmée la journée suivant la ponction d'ovules et si possible, un embryon sera transféré dans la cavité utérine 3 ou 5 jours plus tard. Si l'hyperstimulation ovarienne était importante et que les niveaux d'hormones, plus particulièrement la progestérone, sont trop élevés au moment du prélèvement d'ovules, il est possible que les embryons soient congelés et que le transfert se déroule quelques semaines plus tard.

Environ 12 jours suite au transfert d'embryon, un test de grossesse sous la forme d'un dosage de hCG sanguin sera réalisé à la clinique de fertilité afin de déterminer le succès ou non de la procédure de FIV.

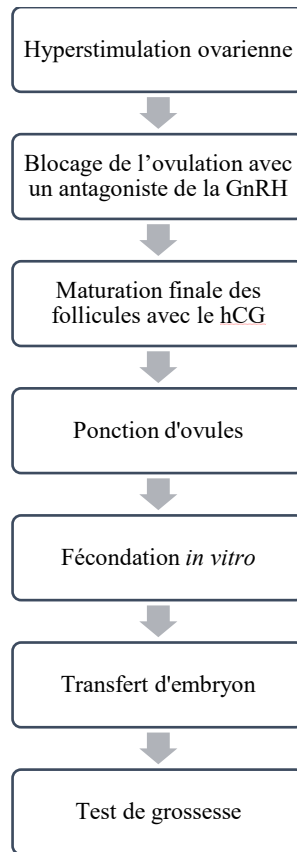


Figure 5 : Résumé des étapes d'une FIV utilisant un antagoniste de la GnRH comme bloqueur de l'ovulation.

Informations tirées de Maldonado *et al.* 2013.

1.4 Lipotoxicité

Tel que décrit dans les sections précédentes, notre laboratoire a émis l'hypothèse que la lipotoxicité au sein des tissus non-adipeux pourrait expliquer les caractéristiques cliniques du SOPK. Les concepts derrière cette théorie seront discutés ci-dessous.

1.4.1 Métabolisme des acides gras non estérifiés

Les acides gras non estérifiés (AGNE) sont des acides carboxyliques qui sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques. Ils composent notamment les phospholipides des membranes cellulaires, servent de seconds messagers et de régulateurs par l'entremise de leurs métabolites (DAG, prostaglandines, leucotriènes) et peuvent agir comme substrat

énergétique suite à la β oxydation (Moussard 2006). Ces lipides peuvent être séparés en AGNE saturés et insaturés selon s'ils possèdent ou non une double liaison. Chez l'humain, le principal AGNE saturé circulant est le palmitate, tandis que l'oléate (monoinsaturé) et le linoléate (polyinsaturé) sont les formes insaturées majoritairement présentes. Par ailleurs, ces 3 métabolites composent plus de 75% des AGNE de la circulation systémique (Carpentier *et al.* 2005). Il est intéressant de constater que l'impact des AGNE sur la tolérance au glucose et le développement du diabète de type 2 varie selon leur formulation chimique. En fait, il a été démontré que les patients présentant un faible ratio d'AGNE polyinsaturés sur saturés ont plus de risque de développer les problèmes métaboliques décrits précédemment (Laaksonen *et al.* 2002).

Les AGNE que l'on retrouve dans la circulation sanguine proviennent majoritairement de l'hydrolyse des triglycérides (TG) du tissu adipeux par la lipase hormonosensible (LHS) (Frayn 1998). Ceci est initié principalement par la baisse des niveaux d'insuline, mais également par l'action des catécholamines (et faiblement du glucagon) qui vont stimuler la phosphorylation de la LHS et des protéines qui stabilisent les gouttelettes lipidiques, les périlipines (White *et al.* 2019). En conséquence, une reconfiguration de l'interface cytoplasmique de l'adipocyte survient et permet la libération des AGNE et du glycérol, les produits d'hydrolyse des TG. Puisque les lipides sont hydrophobes, les AGNE formeront un complexe avec l'albumine afin de pouvoir accéder à la circulation systémique et servir de source d'énergie (White *et al.* 2019). Dans un état postprandial et sous l'action de l'insuline, le mécanisme inverse se produit, c'est-à-dire que les lipides doivent intégrer le tissu adipeux. Pour ce faire, la lipoprotéine lipase (LPL) activée dans le tissu adipeux catalyse l'hydrolyse des TG contenus dans les lipoprotéines riches en TG, telles les chylomicrons ou les very-low-density lipoproteins (VLDL) (Frayn 1998). Les AGNE et le glycérol libérés peuvent ainsi intégrer les adipocytes et être réestérifiés en TG afin d'être stockés jusqu'à leur utilisation.

À noter qu'en cas de besoin, les AGNE peuvent également être synthétisés à partir de l'acétyl-CoA provenant de la glycolyse et du catabolisme protéique. Par contre, comme les niveaux d'AGNE produit de manière endogène sont négligeables par rapport à ceux

provenant de l'alimentation et des TG, les réactions conduisant à leur synthèse ne seront pas abordées dans ce texte.

La lipotoxicité peut être définie comme étant les conséquences cellulaires toxiques résultant d'une surexposition ou d'un excès d'effet des AGNE dans les tissus non adipeux (Carpentier 2008). Ce phénomène peut survenir lorsque le tissu adipeux agit de manière dysfonctionnelle, c'est-à-dire qu'il ne parvient plus à capter les lipides de la circulation systémique. De manière logique, ceci peut se produire chez les individus obèses, chez qui il a été démontré que la relâche des AGNE du tissu adipeux était plus grande que la demande métabolique, provoquant du même coup des concentrations toxiques au niveau des tissus non adipeux, tels les muscles, le foie et les ovaires (Koutsari *et al.* 2006; Engin 2017). De plus, un excès d'AGNE peut entraîner la formation de métabolites non oxydatifs, tels les diglycérides (DAG) et les céramides, dont les conséquences sur la signalisation cellulaire seront décrites ci-dessous.

Par ailleurs, il est important de savoir que la lipotoxicité peut aussi survenir chez les sujets non obèses. En fait, une étude publiée dans *PloS One* en 2014 a été réalisée chez 17 patients non obèses prédisposés au diabète de type 2 et les auteurs ont remarqué que ces sujets avaient davantage de dysfonction de leur tissu adipeux (sous la forme d'hypertrophie adipocytaire) en comparaison avec les individus contrôles (Henninger *et al.* 2014). Dans ce sens, il est possible d'affirmer que la lipotoxicité n'est pas uniquement causée par une surcharge de lipides au niveau du tissu adipeux, mais plutôt par une certaine susceptibilité à ce que ce tissu soit dysfonctionnel, ce qui pourrait expliquer pourquoi certaines femmes SOPK non obèses développent le syndrome.

1.4.2 Impact des AGNE et de leurs métabolites sur la signalisation cellulaire

Comme mentionné, les AGNE peuvent avoir plusieurs conséquences néfastes sur les processus cellulaires de par leur habileté à modifier plusieurs voies de signalisation. Premièrement, de nombreuses études ont démontré que les AGNE et leurs métabolites (DAG et céramides) sont en mesure d'induire des changements au niveaux de la signalisation de

l'insuline, en provoquant notamment l'activation des PKC et de JNK (Rhodes 2005; Carpentier 2008). Une description plus détaillée des mécanismes impliqués sera faite à la section 1.5.2, suite à l'explication de la signalisation de l'insuline et des voies associées.

Il semble aussi que les AGNE, et plus particulièrement ceux saturés, soient en mesure d'activer les récepteurs toll-like (TLR) et d'induire des mécanismes inflammatoires au niveau de la cellule (Lee *et al.* 2006). Ces derniers font partie d'une classe de récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (*pattern recognition receptors*) qui ont pour fonction d'activer le système immunitaire innée en vue de produire des cytokines et chimiokines (Nie *et al.* 2018). Ce rôle serait médié entre autre par l'activation de JNK et de I κ B β par les TLR (Carpentier 2008). Dans le même ordre d'idée, il a été démontré qu'une exposition au palmitate pouvait induire une résistance à l'insuline dans des myotubes et des cellules musculaires de souris par l'activation de PKC, JNK et de I κ B β par les TLR (Senn 2006; Kim *et al.* 2007). Ces protéines peuvent à leur tour mener à la production de cytokines pro-inflammatoires, telles IL-6 et TNF- α , qui sont connues pour phosphoryler en sérine la protéine IRS-1 impliquée dans la signalisation de l'insuline (Hotamisligil *et al.* 1996; Carpentier 2008).

Un autre mécanisme par lequel les AGNE peuvent causer de la lipotoxicité est par leur capacité de former des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Il a été proposé que ces composés chimiques soient formés entre autre suite à une exposition accrue aux AGNE, qui peuvent également causer une dysfonction mitochondriale et une réduction de la capacité oxydative (Carpentier 2008). La production de ROS peut aussi induire l'activation de la voie de signalisation de JNK, ce qui mènera à la relâche du cytochrome C et au clivage de la caspase 3 en vue de provoquer la mort cellulaire par apoptose et par nécrose (Kamata *et al.* 2005).

1.4.3 Lipotoxicité et surproduction d'androgènes

Comme mentionné, plusieurs évidences suggèrent que l'hyperproduction d'androgènes serait liée à la lipotoxicité, et ce dans plusieurs modèles d'étude. Tout d'abord, notre

laboratoire s'est penché sur l'impact *in vitro* d'une exposition au palmitate durant 48 h chez des cellules surrénaliennes bovines en culture primaire. Nous avons pu démontrer que les cellules cultivées dans un milieu lipotoxique en présence de forskolin (Fsk) avait une production de DHEA supérieure de 69 % par rapport aux cellules exposées à la Fsk seulement (Bellanger *et al.* 2012).

Dans une autre étude, nous avons investigué plusieurs paramètres liés à l'hyperandrogénie et à la lipotoxicité dans un modèle de rates JCR:LA, qui sont connues pour développer spontanément les caractéristiques cliniques du SOPK. Nos résultats ont démontré que les rates du groupe expérimental avaient des niveaux de testostérone 3 fois plus élevés que celles du groupe contrôle (Leblanc *et al.* 2014). De plus, la capture ovarienne d'AGNE des rates JCR:LA était 60% plus élevée et était significativement corrélée avec le dosage de testostérone circulant, ce qui renforce le lien potentiel entre la surproduction d'androgènes et la lipotoxicité ovarienne. Dans le même ordre d'idée, chez des femmes en processus de FIV, notre laboratoire a fait la démonstration que les niveaux de testostérone mesurés directement dans le liquide folliculaire étaient significativement associés avec les lipides (AGNE et TG) de cet environnement intra-ovarien (Gervais *et al.* 2015).

Le lien entre la lipotoxicité et la production d'androgènes a également été investigué chez des femmes SOPK non obèses ayant reçu un traitement à base de rosiglitazone (Baillargeon *et al.* 2004). Après les 6 mois de traitement, les participantes avaient des niveaux de testostérone sérique diminués par rapport aux patientes du groupe placebo (3,06 pg/mL vs 7,26 pg/mL). Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que le médicament utilisé, qui fait partie de la famille des agonistes des *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ), agit notamment en réduisant le gras hépatique et viscéral ainsi qu'en diminuant les AGNE de la circulation systémique par une diminution de la lipolyse (DeFronzo 2004). En somme, cette étude est parvenue à démontrer qu'une diminution de la lipotoxicité améliore la production d'androgènes exagérée chez des femmes SOPK qui ne souffrent pas d'obésité.

Par ailleurs, des études réalisées par d'autres groupes de recherche ont mené à des constats similaires. En fait, dans 2 articles publiés dans le *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, il a été montré que l'utilisation d'une infusion de lipides/héparine durant 6 h en vue d'augmenter les niveaux de lipides circulants chez des hommes et des femmes était responsable d'une surproduction de DHEA, et de testostérone chez les femmes, en comparaison avec les résultats obtenus suite à l'infusion d'une solution saline (Mai *et al.* 2006, 2008). À noter que la testostérone n'avait pas été dosée dans la cohorte d'hommes, ce qui explique le manque de données à ce sujet. Finalement, un article publié en 2006 a fait état d'une augmentation de la synthèse de testostérone chez des rats mâles nourris avec une diète contenant 20 % de matières grasses en comparaison avec ceux ayant une diète faible en lipides (5 ou 10 %) (Gromadzka-Ostrowska 2006). L'auteur a également noté une baisse des niveaux de globuline liant les hormones sexuelles (SHBG) chez les rats exposés à la diète riche en lipides, ce qui peut assurément contribuer à la hausse des androgènes circulants. Aussi, il est connu que les AGNE saturés sont capables de diminuer la liaison entre la SHBG et les androgènes, puisqu'ils possèdent une affinité supérieure pour la protéine de liaison (Street *et al.* 1989).

1.5 Insuline

L'insuline est une hormone anabolique dont le rôle principal est le maintien de niveaux normaux de la glycémie. Afin de réguler les taux de glucose sanguin, elle est également impliquée dans la synthèse protéique au niveau des muscles ainsi que dans la formation de glycogène par le foie (White *et al.* 2019).

L'insuline est tout d'abord synthétisée sous la forme de préproinsuline dans les cellules β du pancréas. Dans le réticulum endoplasmique, ce précurseur est transformé en proinsuline qui sera transportée vers l'appareil de Golgi jusqu'aux granules de sécrétion. La proinsuline contient à la fois l'insuline, mais également le peptide C qui est situé entre les chaînes α et β de l'insuline (White *et al.* 2019). Dans les granules se trouvent aussi les prohormones convertase 2 et 3 qui permettent la séparation de l'insuline et du peptide C.

La sécrétion de l'insuline à partir des cellules β est initiée par la liaison du glucose sanguin au transporteur GLUT2, ce qui permettra son entrée dans la cellule pancréatique. Il sera ensuite phosphorylé par l'enzyme glucokinase en glucose-6-phosphate (G6P) pour entrer dans différentes voies métaboliques, comme la glycolyse. Ceci permettra la formation d'ATP et la fermeture du canal K^+ sensible à l'ATP, menant ainsi à la dépolarisation de la cellule β (White *et al.* 2019). Cette diminution du voltage intracellulaire entraînera l'ouverture des canaux calciques dépendant du voltage et l'augmentation des niveaux de calcium intracellulaire, provoquant de ce fait la sécrétion du contenu des granules de sécrétion vers la veine porte.

1.5.1 Signalisation de l'insuline

Le récepteur de l'insuline fait partie de la famille des récepteurs à tyrosine kinase. Il s'agit d'un tétramère composé de 2 sous-unités α extracellulaires et de 2 sous-unités β à la membrane. Suite à la liaison de l'insuline au niveau des sous-unités α , un changement conformationnel permettra la stimulation de l'activité tyrosine kinase intrinsèque des sous-unités β , provoquant ainsi une auto-phosphorylation du récepteur sur 3 de ses résidus tyrosine (Hirabara *et al.* 2012; White *et al.* 2019). Ces phosphorylations sont essentielles à la liaison d'une protéine adaptatrice nommée l'*insulin-receptor substrate* (IRS), qui se décline en 4 isoformes. Celle-ci sera également phosphorylée en tyrosine par le récepteur à l'insuline et servira à son tour de protéine adaptatrice. En fait, elle permettra le recrutement à la membrane de PI3K et de Grb-2 dont les voies de signalisation associées seront expliquées ci-dessous.

Comme décrit à la figure 6, la protéine PI3K est composée de 2 sous-unités, soit d'une sous-unité catalytique (p110) et d'une régulatrice (p85). Suite à la liaison de p85 à IRS1/2 phosphorylée en tyrosine présente à la membrane, il y aura activation de la sous-unité catalytique de PI3K, résultant en la formation de PIP3 à partir de PIP2. Ceci mènera à l'activation de la protéine PDK-1 qui phosphorylera Akt sur des résidus de sa boucle d'activation (Hirabara *et al.* 2012). Les effets métaboliques liés à l'activation d'Akt sont nombreux et comprennent notamment la translocation du transporteur GLUT4 à la

membrane au niveau des muscles et du tissu adipeux, la synthèse de glycogène et de protéines ainsi que des effets anti-apoptotiques (Hirabara *et al.* 2012; White *et al.* 2019).

La voie des MAPK peut également être activée suite à la liaison de l'insuline sur son récepteur. En fait, la protéine Shc peut se lier au récepteur à l'insuline phosphorylé et former un complexe avec Grb-2. Par contre, comme mentionné plutôt, Grb-2 peut aussi lier les protéines adaptatrices IRS. Ensuite, la protéine SOS ira à la membrane pour lier Grb-2, ce qui résultera en l'activation de Ras, menant à la phosphorylation et à l'activation de ERK1/2 (Hirabara *et al.* 2012). Cette voie de signalisation est importante pour les effets mitogéniques de l'insuline, puisqu'elle est davantage impliquée dans la croissance cellulaire et la différenciation.

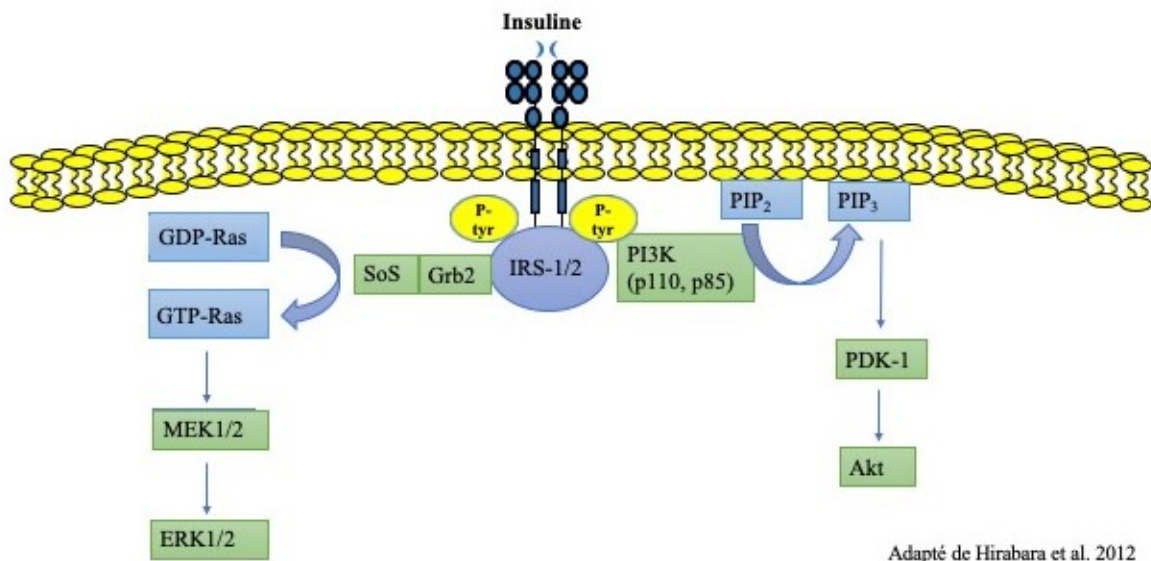


Figure 6 : Signalisation de l'insuline et activation des voies PI3K/Akt et MAPK

Suite à la liaison de l'insuline et à l'activation de l'activité tyrosine kinase de son récepteur, les protéines IRS seront phosphorylées et pourront se lier au récepteur à l'insuline afin de servir de protéine adaptatrice pour l'activation des voies d'Akt et de MAPK.

Par ailleurs, il est possible d'empêcher l'activation de ces voies de signalisation de l'insuline par la phosphorylation en sérine des protéines IRS et des sous-unités β du récepteur à l'insuline. Il est connu que plusieurs kinases telles JNK, PKC et I κ B β sont en mesure de

phosphoryler les IRS en sérine, ce qui empêche leur phosphorylation en tyrosine par le récepteur à l'insuline ainsi que les actions métaboliques et mitogéniques de l'hormone (Haruta *et al.* 2000; Nawaratne *et al.* 2006; Barbour *et al.* 2007). Aussi, il a été avancé que cette phosphorylation en sérine des IRS accélère leur dégradation (Haruta *et al.* 2000). La perte de la capacité de répondre à l'insuline causée par ce mécanisme pourrait donc contribuer à créer une résistance à l'insuline chez les individus, comme il en sera question dans la section 1.6.1.

1.5.2 Signalisation de l'insuline et lipotoxicité

Depuis plusieurs années, l'impact des lipides sur les médiateurs de la signalisation de l'insuline est investigué par de nombreux chercheurs pour mieux comprendre les mécanismes derrière la résistance à l'insuline, notamment. Un résumé des découvertes importantes à ce sujet sera effectué dans cette présente section.

Tout d'abord, comme expliqué à la section 1.3.2, il a été démontré que les AGNE et leurs métabolites DAG et céramides peuvent modifier la signalisation de l'insuline en induisant la phosphorylation en sérine des IRS par l'activation de diverses kinases, réduisant du même coup les effets cellulaires de l'insuline (Carpentier 2008). En fait, une équipe de recherche a pu montrer que des rats recevant une infusion de lipides/héparine pour augmenter les niveaux de lipides circulants avaient une diminution de la protéine et de l'ARNm GLUT4 dans leurs cellules musculaires (Vettor *et al.* 2000). Dans le même ordre d'idée, il a également été prouvé que le palmitate et les céramides peuvent induire la déphosphorylation de la protéine Akt par leur action d'activation de sérine/thréonine phosphatases de la famille des protéines phosphatases 2 (PP2A), ce qui a comme conséquence de diminuer la signalisation de l'insuline (Law *et al.* 1995; Cazzolli *et al.* 2001). Cette découverte sur l'impact de la lipotoxicité peut expliquer un résultat publié dans la revue *Diabetes* en 2008, qui évoquait que les muscles squelettiques de femmes SOPK avaient des niveaux diminués de la protéine Akt phosphorylée en sérine et thréonine par rapport à ce qui a été obtenu chez les femmes normales (Højlund *et al.* 2008). De plus, dans cette même étude, un traitement de 16 semaines à la pioglitazone, un agoniste de PPAR γ qui traite la lipotoxicité, a permis de normaliser la phosphorylation d'Akt des cellules musculaires chez les femmes SOPK. Ceci

nous permet donc de mettre en lumière l'impact des modifications de la signalisation de l'insuline, et aussi possiblement de la lipotoxicité suite au résultat avec la pioglitazone, sur la résistance à l'insuline des femmes SOPK.

Une dysfonction dans la signalisation de l'insuline chez les femmes SOPK a également été constatée par Corbould et ses collaborateurs lors de l'étude de cellules musculaires mises en culture. Ce groupe a constaté que les cellules des femmes SOPK avaient une augmentation de 2 fois de la phosphorylation en sérine³¹² de la protéine IRS-1 par rapport aux patientes contrôles, diminuant ainsi la phosphorylation en tyrosine de IRS-1 (Corbould *et al.* 2005). De plus, la signalisation de l'insuline via IRS-2 était affectée dans les cellules musculaires des femmes SOPK dans cette étude, possiblement à cause de la dégradation prématurée de cette protéine.

Il existe également des évidences d'un dérèglement de la voie des MAPK par la lipotoxicité. Dans un modèle de cellules surrénaliennes bovines en culture, notre laboratoire a remarqué une baisse de la phosphorylation de ERK1/2 de 49 % suite à un traitement de 48 h à 100 μ M de palmitate et à la Fsk (Bellanger *et al.* 2012). Un résultat similaire a été obtenu dans des fibroblastes de souris en culture surexprimant le récepteur à l'insuline. En effet, les cellules exposées à 1000 μ M de palmitate durant 1 h avaient également une diminution de leur activité MAP kinase en comparaison avec la condition contrôle (Usui *et al.* 1997).

1.5.3 Signalisation de l'insuline et surproduction d'androgènes

Grâce aux données présentes dans la littérature, il devient de plus en plus évident que des modifications au niveau de la voie de ERK1/2 sont impliquées dans l'hyperandrogénisme des femmes SOPK. En 2004, une étude réalisée dans un modèle *in vitro* de cellules thécales de femmes normales pré-ménopausées a fait état d'une augmentation de l'activité de l'enzyme P450c17 suite à l'inhibition de la voie de ERK1/2 avec le composé PD98059 (Munir *et al.* 2004). De plus, il a été rapporté que cette voie de signalisation a également un effet inhibiteur sur l'expression du gène de la P450c17 dans une lignée de cellules surrénaliennes humaines, les NCI-H295R (Sewer *et al.* 2003). Ces résultats ainsi que ceux

de Bellanger *et al.* nous amènent donc à penser que la lipotoxicité présente chez les femmes SOPK pourrait causer une diminution de la signalisation de ERK1/2 et être responsable de l'importante production d'androgènes ainsi que des caractéristiques cliniques qui y sont associées. Les données issues d'un article publié en 2005 par un groupe de recherche américain tendent à confirmer cette hypothèse. En effet, ils ont étudié la voie de ERK1/2 dans des cellules thécales de femmes SOPK et ils ont trouvé que la phosphorylation de ERK1/2 et MEK1/2 était significativement réduite en comparaison avec les cellules contrôles, et que l'infection avec un dominant négatif de MEK1 augmentait leur expression de l'ARNm de la P450c17 ainsi que leur production de DHEA (Nelson-Degrave *et al.* 2005).

Il semble aussi qu'une autre voie impliquée dans la signalisation de l'insuline, soit celle de PI3K/Akt, ait un impact sur la stéroïdogénèse ovarienne. À l'inverse de ce qui a été obtenu suite à l'inhibition de ERK1/2, l'utilisation d'un composé inhibiteur de PI3K (LY294002) dans le milieu de culture de cellules thécales a permis de mettre en évidence la diminution de l'activité de la P450c17 (Munir *et al.* 2004). Puisque l'activation des voies de PI3K/Akt et de ERK1/2 dépend de la liaison des protéines adaptatrices sur les IRS, des dysfonctions signalétiques pourraient donc survenir si ces dernières possèdent des phosphorylations inhibitrices sur leurs résidus sérine, modifiant sur même coup l'androgénèse.

Par ailleurs, il a été proposé que les protéines p38 et JNK pourraient contribuer à augmenter l'activité de la P450c17 et la production d'androgènes (Baptiste *et al.* 2010). Puisqu'il est connu que ces kinases sont activées par les AGNE et qu'ils peuvent phosphoryler les IRS sur leurs résidus sérine, il est possible d'envisager que l'augmentation de la stéroïdogénèse causée par la lipotoxicité implique une diminution de la signalisation de l'insuline par l'action de p38 et de JNK.

1.6 Protéines kinases C

Les protéines kinases C (PKC) font partie d'une famille de sérine/thréonine kinases qui est impliquée dans de multiples voies de signalisation cellulaire. On retrouve plusieurs isoformes différents, mais qui possèdent tous la même structure de base. En fait, les PKC

sont constituées d'un domaine de régulation et d'un domaine catalytique qui lie l'ATP et les substrats de la protéine (Steinberg 2012). Un pseudosubstrat inhibiteur est situé au niveau du domaine de régulation et permet de conserver l'enzyme dans un état inactif en empêchant la liaison des métabolites activateurs située à la membrane. Ceux-ci varient entre les différents groupes de PKC qui existent. Premièrement, il y a les PKC classiques (α , $\beta 1$, $\beta 2$, et γ) qui possèdent les motifs de liaison pour les DAG et le PMA (motifs C1A et C1B) ainsi que pour le calcium (motif C2). Les PKC nouvelles (η , θ , ε et δ) possèdent quant à elles les mêmes motifs de liaison que les PKC classiques, mais puisque le motif C2 est situé en amont du pseudosubstrat inhibiteur et qu'il lui manque les résidus nécessaires à la liaison du calcium, ces protéines n'ont besoin que de DAG pour être activées (Steinberg 2012). Finalement, les PKC atypiques (ι , λ et ζ) ne peuvent lier les DAG et le calcium. Elles ont plutôt un domaine C1 pour les céramides et PIP₃ ainsi qu'un domaine PB1 pour leur permettre d'interagir avec d'autres protéines, de sorte que leur activation se fait indépendamment de la liaison de DAG et de calcium (Steinberg 2012).

Un modèle général d'activation des PKC a été établi à partir de la protéine PKC α . Les PKC inactives se trouvent dans le cytosol où le pseudosubstrat inhibiteur cache le domaine catalytique de l'enzyme. Suite à l'hydrolyse par certains agonistes de PIP₂ en DAG et IP₃, du calcium sera libéré du réticulum endoplasmique et la liaison des domaines C1 et C2 pourra se faire dans le compartiment membranaire. À ce moment, un changement conformationnel permettra de retirer le pseudosubstrat inhibiteur du domaine catalytique et la PKC pourra ensuite phosphoryler en sérine ou thréonine ses cibles au niveau de la membrane (Steinberg 2012). Il est important de retenir ici que contrairement aux PKC inactives, la forme active se retrouve dans le compartiment membranaire de la cellule.

Un autre mécanisme pouvant être impliqué dans l'activation des PKC est leur phosphorylation par la protéine PDK-1. Il semble que cette phosphorylation dans la boucle d'activation survient suite à la synthèse de la PKC et qu'elle a pour but de la rendre éligible à être activée par le mécanisme décrit ci-haut (Spitaler *et al.* 2004). Par contre, l'étude de la phosphorylation des PKC n'est pas un bon indicateur pour se renseigner sur leur activation,

puisqu'elles peuvent être phosphorylées et se retrouver au cytosol, c'est-à-dire dans un état inactif.

1.6.1 PKC, lipides et signalisation de l'insuline

Comme décrit à la section 1.4.2, il est connu que les AGNE et leurs métabolites peuvent provoquer l'activation des PKC (Carpentier 2008). Cette observation a été faite dans de nombreux modèles, dont chez des cellules musculaires de rats ayant reçu une infusion de lipides/héparine associée à une clamp euglycémique hyperinsulinémique durant 5 h pour augmenter les niveaux de lipides sanguins (Griffin *et al.* 1999). Les auteurs ont remarqué une augmentation de 2 fois de l'expression membranaire de PKC θ dans les cellules musculaires du groupe expérimental en comparaison avec les rats contrôles. Cette infusion associée à la clamp a aussi permis d'induire une résistance à l'insuline chez les rats, se traduisant par une diminution de 35 % de l'injection de glucose et par une inhibition de 25 % de la capture du glucose par les muscles mesurée par le 2-[1,2-3H]déoxyglucose. Suite à ces résultats, Griffin et ses collaborateurs ont affirmé que la diminution des actions de l'insuline pourrait être médiée par l'activation des PKC par les AGNE, selon des mécanismes qui seront discutés dans cette présente section.

De plus, une expérience similaire a été réalisée chez une cohorte de 12 hommes recevant eux aussi une infusion de lipides/héparine (Itani *et al.* 2002). Après 6 h d'infusion, une biopsie a été faite afin d'étudier l'activation des PKC dans les cellules musculaires et il a été démontré que l'activation des PKC β et δ était augmentée par rapport aux résultats obtenus avant le début de l'expérimentation. Les chercheurs ont donc conclu à un rôle important de l'activation des PKC par les AGNE dans l'induction d'une résistance à l'insuline causée par les lipides. Cette étude visait à poursuivre les recherches amorcées sur les liens entre les PKC, la résistance à l'insuline et la lipotoxicité, puisque les auteurs avaient déjà prouvé dans un article précédent que la fraction membranaire de PKC β était supérieure dans les cellules musculaires des individus obèses et résistants à l'insuline, en comparaison avec des patients minces et sensibles à l'insuline (Itani *et al.* 2000).

Tel que préalablement mentionné, l'activation des PKC, notamment par les AGNE et leurs métabolites, peut mener à des dérèglements au niveau de la signalisation de l'insuline. En effet, un essai kinase in vitro réalisé dans des cellules NIH/hIR, des fibroblastes de souris exprimant le récepteur à l'insuline humain, a permis d'établir que les PKC α , δ , et ζ sont en mesure de phosphoryler IRS-1 sur ses résidus sérine, diminuant sa phosphorylation en tyrosine et la liaison des protéines adaptatrices décrites à la section 1.5.1 (Nawaratne *et al.* 2006). En fait, plusieurs auteurs ont fait état d'une diminution de la liaison de la protéine PI3K et une baisse du transport du glucose suite à l'activation des PKC par les AGNE, causant une résistance à l'insuline (Griffin *et al.* 1999; Dresner *et al.* 1999; Girard 2003).

Finalement, il semblerait que l'activation de la voie de ERK1/2 soit également affectée par la présence des PKC dans le compartiment membranaire. Un groupe de recherche américain a utilisé une lignée cellulaire de myotubes de souris, les C₂C₁₂, qu'ils ont transfectés avec un petit ARN en épingle à cheveux (shRNA) pour réduire l'expression du gène de PKC θ (Marino *et al.* 2013). Après 4 jours de culture, la phosphorylation en sérine de la protéine IRS-1 et la phosphorylation de ERK1/2 ont été étudiées chez les cellules PKC θ^{shRNA} et chez les cellules contrôles. De manière intéressante, les myotubes PKC θ^{shRNA} avaient une diminution de la phosphorylation en sérine¹⁰⁹⁵ de IRS-1 ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 par rapport aux cellules non transfectées. Cette étude nous amène donc à penser que les PKC activées, par leur action sur la phosphorylation de la protéine IRS-1, peuvent induire des modifications au niveau de la signalisation de l'insuline.

1.7 Hypothèses

Les données des études présentées dans l'introduction ont amené notre laboratoire à poser l'hypothèse que la lipotoxicité pourrait être responsable de la surproduction d'androgènes et des autres caractéristiques cliniques retrouvées chez les femmes SOPK. Pour étudier cette théorie, 2 projets de recherche ont été effectués dans le cadre de ma maîtrise, dont leurs hypothèses de travail respectives sont détaillées ci-dessous.

Hypothèse de recherche du projet 1 :

Nous croyons que des hauts niveaux de lipides (AGNE + TG) dans le liquide folliculaire peuvent induire l'activation dans les cellules de la granulosa de sérine/thréonine kinases, notamment les PKC, ce qui mènera à la phosphorylation en sérine de IRS-1 et d'une dysfonction au niveau des voies de signalisation de l'insuline. Ces perturbations cellulaires pourraient ensuite affecter la stéroïdogénèse ovarienne et les issues de fertilité évaluées dans le cadre d'une FIV.

Hypothèse de recherche du projet 2 :

Dans la même lignée que l'hypothèse du projet 1, nous sommes d'avis que des cellules surrénaliennes humaines cultivées dans un milieu lipotoxique auront une production d'androgènes augmentée par rapport aux cellules non exposées, ce qui pourrait être expliqué par l'action néfaste des lipides sur les protéines de la stéroïdogénèse ainsi que sur celles impliquées dans la signalisation de l'insuline.

1.7.1 Objectifs

Objectifs du projet 1 :

Le premier objectif est de comparer les paramètres suivants chez des femmes en processus de FIV ayant des niveaux élevés ($\geq 50^{\text{e}}$ percentile) vs bas ($< 50^{\text{e}}$ percentile) de lipides dans leur liquide folliculaire :

- Les mesures anthropométriques, la production de testostérone et le ratio estradiol/progestérone du liquide folliculaire et du sang
- L'expression et la localisation des PKC et de certains médiateurs de la signalisation de l'insuline dans les cellules de la granulosa
- Les issues de fertilité

Le second objectif de ce projet est de corrélérer les paramètres suivants entre-eux :

- Les mesures anthropométriques, les niveaux de lipides (AGNE +TG), la production de testostérone et le ratio estradiol/progestérone du liquide folliculaire et du sang
- L'expression et la localisation des PKC et de certains médiateurs de la signalisation de l'insuline dans les cellules de la granulosa
- Les issues de fertilité

Objectifs du projet 2 :

Déterminer sur des cellules surrénaliennes humaines (la lignée cellulaire NCI-H295R et des cellules en culture primaire), l'impact des AGNE sur les paramètres suivants :

- La production d'androgènes
- La phosphorylation de certains médiateurs de l'insuline
- L'expression des enzymes de la stéroïdogénèse et de leurs cofacteurs

MATÉRIEL ET MÉTHODES (PROJET 1)

2.1 Population à l'étude

Afin d'atteindre les objectifs du projet, des femmes en processus de FIV ont été recrutées. Ce choix s'explique par le fait que la récolte de liquide folliculaire et des cellules de la granulosa doit se faire dans le cadre d'un prélèvement d'ovules, qui est une procédure médicale effectuée par un gynécologue-obstétricien. Cette ponction étant trop invasive pour être effectuée à des fins de recherche seulement, la meilleure façon d'obtenir les échantillons désirés était donc de recruter des patientes qui devaient avoir un prélèvement d'ovules pour une raison médicale. Par ailleurs, comme le liquide folliculaire et les cellules de la granulosa qu'il contient sont normalement jetés après la récolte des ovules, la participation au projet ne recherche n'avait pas d'impact sur le cycle de FIV des patientes, car aucun prélèvement supplémentaire outre la prise de sang n'était demandé.

2.1.1 Sélection des participantes

Notre étude comprenait différents critères d'inclusion et d'exclusion qui devaient être respectés par les patientes participant au projet de recherche. Ceux-ci sont détaillés dans le tableau 2. À noter que la prise de metformine, un sensibilisateur à l'insuline, était acceptée durant l'étude, puisque plusieurs femmes SOPK prennent cette médication pour leur condition médicale. Il aurait été donc peu probable de pouvoir recruter des femmes SOPK si l'utilisation de metformine faisait partie des critères d'exclusion.

Tableau 2 : Critères d'inclusion et d'exclusion des participantes recrutées

Critères d'inclusion	Critères d'exclusion
Être en processus de FIV	Utilisation de médicaments affectant le métabolisme du glucose ou des lipides (sauf la metformine)
Entre 18 et 40 ans	Diabète
IMC entre 18 et 40 kg/m ²	Alcoolisme ou abus de drogues
	Tabagisme
	Cause secondaire d'infertilité tel que : hypothyroïdie, hyperprolactinémie, hyperplasie congénitale des surrénales, tumeur sécrétrice d'androgènes, syndrome de Cushing, acromégalie, etc...

2.1.2 Recrutement des participantes

Le recrutement des patientes s'est déroulé à 3 cliniques de fertilité, soient : CIUSS de l'Estrie-CHUS, Procréa Fertilité Montréal et clinique OVO Montréal. Après avoir évalué l'éligibilité des patientes en processus de FIV, le premier contact était fait par une infirmière qui leur proposait d'être contacté pour participer à un projet de recherche. Si elles acceptaient, la responsable du projet les rencontrait ou les appelait afin de leur expliquer le projet en détail et d'évaluer leur intérêt. Lorsque les patientes acceptaient de participer à l'étude, le formulaire de consentement était signé en personne ou retourné à la responsable par courriel. Par la suite, chaque participante s'était vu attribuer un numéro afin de s'assurer de la confidentialité et nous procédions à l'obtention des données comme indiqué dans la section suivante.

Après avoir effectué les dosages d'AGNE et de TG dans le liquide folliculaire et additionné ces valeurs, nous avons pu séparer les participantes en 2 groupes, soient celles qui avaient des niveaux bas (< 50^e percentile des femmes recrutées) d'AGNE+TG dans le liquide folliculaire et celles qui avaient des niveaux élevés (≥50^e percentile). Ces groupes ont été utilisés afin de comparer plusieurs variables tel que décrit dans les objectifs du projet.

2.2 Obtention des données cliniques

2.2.1 Informations fournies par les patientes

Après la signature du formulaire de consentement, quelques questions étaient posées aux participantes. Ceci nous a permis de récolter les informations sur la présence ou non d'oligoménorrhée et d'hyperandrogénie clinique (acné, alopecie, hirsutisme). Par ailleurs, nous avons questionné les patientes sur leur prise de tabac et d'alcool afin de s'assurer qu'elles ne figuraient pas dans les critères d'exclusion.

2.2.2 Prise des mesures anthropométriques

Les différentes mesures anthropométriques ont été prises au moment du recrutement (participantes recrutées au CIUSS de l'Estrie-CHUS) ou le matin même du prélèvement d'ovules (participantes recrutées via les cliniques Procréa Fertilité ou OVO, puisque ces dernières étaient recrutées par téléphone.

La tension artérielle en position assise a été mesurée à l'aide d'un tensiomètre. Deux mesures ont été effectuées et si l'écart était supérieur à 10 mm Hg, une troisième était prise et une moyenne était faite avec les 2 mesures les plus près. La taille a été mesurée avec un stadiomètre et le poids des participantes a également été relevé. Finalement, un ruban conçu pour mesurer le tour de taille a été utilisé. La lecture a été réalisée en position debout, en plaçant le ruban sur le bord supérieur de la crête iliaque.

2.2.3 Données cliniques tirées du dossier médical

L'accès au dossier médical des participantes nous a permis de noter différentes informations qui sont indiquées dans le tableau 3 ci-dessous. À noter que les données concernant le nombre d'embryons transférés et implantés ainsi que le succès de la FIV ont été considérées seulement pour le premier transfert d'embryon des patientes afin d'uniformiser les informations recueillies.

Tableau 3 : Informations tirées du dossier médical des participantes

Caractéristiques	Issues de fertilité
Âge	Nombre d'ovules : récoltés, au stade MII, injectés, fécondés
Cause d'infertilité	Nombre d'embryons : au jour 3, transférés, implantés
Prise de metformine	Succès de la FIV (β -hCG ≥ 1)
Valeur d'hyperglycémie orale provoquée antérieure (si faite), glycémie, hémoglobine glyquée	
Diagnostic de SOPK fait par le médecin traitant	

2.3 Récolte des échantillons biologiques

2.3.1 Sang

Pour les patientes ayant consenti à la prise de sang, un prélèvement constitué de 2 tubes lavande pour le plasma *BD Vacutainer* (# Cat 367861) et 1 tube jaune pour le sérum *BD Vacutainer* (# Cat 367886) était effectué le matin du prélèvement d'ovules par une infirmière de la clinique. Par la suite, de l'aprotinine était ajoutée à ces tubes avant la centrifugation à 2 500 g durant 10 minutes. À noter que les tubes jaunes ont été laissés 30 minutes à TP avant d'être centrifugés pour que le sang puisse coaguler adéquatement. Après la centrifugation, le plasma et le sérum ont été aliquotés dans des Eppendorfs de 0,5 mL et placés dans une boîte en carton sur glace sèche jusqu'à l'arrivée au CR-CHUS où ils ont été conservés à -80 °C jusqu'à leur dosage.

2.3.2 Liquide folliculaire et cellules de la granulosa

Suite au prélèvement d'ovules, le liquide folliculaire était récupéré dans des tubes Falcons de 50 mL et centrifugé durant 10 minutes à 800 g. Ensuite, 18 mL de liquide folliculaire ont été récupérés et de l'aprotinine y a été ajoutée avant d'aliquoter ce liquide dans des tubes Eppendorfs de 2 mL. Ils ont par la suite été congelés tel que décrit ci-dessus pour les échantillons sanguins.

Après la centrifugation du liquide folliculaire, le culot était constitué des cellules de la granulosa, des globules rouges et des globules blancs. Ce dernier a été récupéré et resuspendus dans 2 à 4 mL de solution de congélation *Bambanker* (Wako Chemicals, # Cat 30214681). L'échantillon cellulaire a été aliquoté dans des cryovials de 2 mL qui ont été placés dans une boîte de congélation *Mr Frosty* (ThermoFisher, # Cat 5100-0001) qui était préalablement à TP. Celle-ci a été placée sur glace sèche jusqu'à l'arrivée au CR-CHUS, où les cryovials ont été déplacés dans un congélateur à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

2.4 Analyses protéiques des cellules de la granulosa

2.4.1 Décongélation et purification des cellules de la granulosa

Une fois les cellules décongelées sur glace, celles-ci ont été transférées dans un tube Falcon de 15 mL contenant 10 mL de DMEM-F12 froid. Ce tube a été centrifugé à 800 g durant 10 minutes à 4 °C pour récupérer le culot de cellules et se débarrasser de la solution de congélation. Le culot a par la suite été resuspendu dans 5 mL de DMEM-F12 froid avant de procéder à la purification au Percoll.

Une solution de Percoll 50% a été préparée à partir de Percoll 90% et de HBSS 1x. Un total de 3 mL de Percoll 50% froid a été pipeté dans un tube Falcon 50 mL et la suspension cellulaire a été déposée doucement sur le Percoll avec une pipette de verre en s'assurant que les phases restent séparées. Ensuite, le tube Falcon a été centrifugé à 500 g durant 15 minutes à 4 °C sans frein et à faible accélération. Le DMEM-F12 au-dessus du tube a été jeté après

la centrifugation et les cellules présentes à l'interphase ont été récupérées, resuspendues dans 15 mL de DMEM-F12 froid et centrifugées à 800 g durant 10 minutes à 4 °C pour se débarrasser du surplus de solution de Percoll. Le culot cellulaire a été resuspendu dans 2 mL de DMEM-F12 froid avant de procéder aux différentes expériences.

2.4.2 Séparation des fractions cytosoliques et membranaires

Après la purification au Percoll, environ 10 millions de cellules de la granulosa ont été nécessaires afin de procéder à l'expérimentation visant à séparer leurs fractions membranaires et cytosoliques. Pour ce faire, un kit commercial d'extraction protéique (Biochain, # Cat K3012010) a été utilisé. Plusieurs modifications au protocole du commerçant ont dû être effectuées afin d'obtenir une concentration de protéines suffisante dans les fractions cytosoliques et membranaires en vue de réaliser des buvardages.

Dans un premier temps, les cellules de la granulosa étaient incubées sur un appareil rotatif durant 20 minutes à 4 °C dans 500 µL de tampon C additionné d'inhibiteurs de protéases fournis par la compagnie. Ensuite, l'échantillon a été homogénéisé avec un appareil de sonication 5 fois durant 10 secondes, avec un arrêt de 10 secondes sur glace entre chaque fois. L'échantillon a été centrifugé à une vitesse de 15 000 g à 4 °C durant 20 minutes. Le surnageant, qui contenait la fraction cytosolique, a été transféré dans un Eppendorf 1,5 mL et conservé à -80 °C. Le culot a été resuspendu dans 1 mL de tampon de lavage W et placé sur un appareil rotatif durant 5 minutes à 4 °C pour être ensuite centrifugé à 15 000 g à 4 °C durant 20 minutes. Le surnageant a été jeté et cette étape de lavage a été répétée une seconde fois pour bien éliminer la fraction de protéines cytosoliques. Pour extraire la fraction nucléaire (étape nécessaire pour la réalisation du protocole), le culot obtenu après le 2^e lavage a été resuspendu dans 250 µL de tampon N additionné d'inhibiteurs de protéases et placé sur un appareil rotatif durant 20 minutes à 4 °C. Par la suite, l'échantillon a été centrifugé à 15 000 g à 4 °C durant 20 minutes et le surnageant contenant la fraction nucléaire a été transférée dans un Eppendorf 0,5 mL et congelé à -80 °C. Une étape de lavage selon les conditions décrites ci-dessus a été réalisée après l'extraction de la fraction nucléaire. Après, le culot restant a été resuspendu dans 70 µL de tampon N additionné d'inhibiteurs de

protéases et incubé sur un appareil rotatif durant 20 minutes à 4 °C. Il a par la suite été centrifugé à 15 000 g à 4 °C durant 20 minutes. La fraction membranaire retrouvée dans le surnageant a été transférée dans un Eppendorf 0,5 mL et a été conservée à -80 °C jusqu'à son utilisation.

Tableau 4 : Composition des tampons d'extraction utilisés pour séparer les fractions cytosoliques et membranaires des cellules de la granulosa

Tampon	Composition
C	HEPES (pH 7.9), MgCl ₂ , KCl, EDTA, sucrose, glycérol, sodium orthovanadate
W	HEPES (pH 7.9), MgCl ₂ , KCl, EDTA, sucrose, glycérol, sodium orthovanadate
N	HEPES (pH 7.9), MgCl ₂ , NaCl, EDTA, glycérol, sodium orthovanadate
M	HEPES (pH 7.9), MgCl ₂ , KCl, EDTA, sucrose, glycérol, sodium deoxycholate, NP-40, sodium orthovanadate

La méthode visant à séparer les fractions cytosoliques et membranaires a pris un peu plus de 9 mois à développer. En effet, nous avons essayé dans un premier temps de réaliser cette séparation avec un protocole d'ultracentrifugations avec des tampons similaires à ce qui a été utilisé dans le kit commercial. Par contre, malgré plusieurs modifications, nous n'avons pas été en mesure d'obtenir une concentration de protéines suffisante dans nos fractions pour faire des buvardages. Nous avons donc essayé par la suite de concentrer ces fractions protéiques en faisant une précipitation à l'acétone et en utilisant des tubes d'ultrafiltration qui concentrent les échantillons protéiques (Millipore Sigma, # Cat UFC510024). Comme ces méthodes n'ont pas fonctionné, nous avons décidé de nous tourner vers un kit de séparation commercial dont les modifications apportées ont été décrites dans cette présente section.

2.4.3 Dosage protéique et buvardage de type Western des fractions cytosoliques et membranaires

Les fractions membranaires et cytosoliques des cellules de la granulosa ont été dosées avec un kit commercial BCA (ThermoFisher, # Cat 23227) selon le protocole recommandé par le fabricant.

Afin de déterminer l'expression des PKC dans les échantillons, 30 µg de protéines cytosoliques ou membranaires ont été dénaturées dans un tampon Laemmli 6X (Tris-HCl [0,375 M, pH 6,8], SDS [9 %], glycérol [50 %], bleu de bromophénol [0,03 %], et β-mercaptoéthanol [9 %]). Les échantillons ont par la suite été déposés dans un bloc chauffant à 95 °C durant 5 minutes et déposés sur un gel de polyacrylamide SDS-PAGE 10% pour les protéines cytosoliques et 7,5% pour les protéines membranaires dont la composition est décrite dans le tableau ci-dessous.

Tableau 5 : Composition des gels de polyacrylamides utilisés pour les buvardages de type Western

Ingrédient	Gel de concentration 4 %	Gel de séparation 7,5 %	Gel de séparation 10 %
H ₂ O (mL)	2,4	3,88	3,21
Tris-HCl 1,5 M ; pH 8,8 (mL)	N/A	2,0	2
Tris-HCl 0,5 M ; pH 6,8 (mL)	1,0	N/A	N/A
Acrylamide-bis 37,5:1 ; 30 % (mL)	0,53	2,0	2,67
SDS 10 % (mL)	0,04	0,08	0,08
APS 10 % (mL)	0,02	0,04	0,04
TEMED (µL)	4,0	4,0	4,0

La migration des échantillons s'est faite dans un tampon contenant du Tris-base (25 mM), de la glycine (192 mM) et du SDS (0,1 %) durant 30 minutes à 100 V et ensuite durant 1h30 à 200 V. Le transfert des protéines s'est fait sur une membrane PVDF en utilisant un tampon composé de Tris-Base (25 mM), de glycine (192 mM) et de méthanol (15 %) avec un courant de 0,09 mA durant 16h à 4 °C. Suite à cette étape, la membrane a été placée dans une solution de TBS-T (Tris-Base [20 mM, pH 7,5], NaCl [150 mM] et Tween-20 [0,1 %]) durant 10 minutes avant la bloquer durant 1h à TP dans une solution de lait écrémé en poudre (5 %) dilué dans du TBS-T. La membrane a ensuite été incubée durant 2h à TP avec l'anticorps primaire d'intérêt préalablement dilué 1/1000 dans la solution de blocage. Afin de retirer l'anticorps primaire non lié, 3 rinçages de 10 minutes chacun avec du TBS-T ont été faits avant que la membrane soit incubée avec l'anticorps secondaire approprié durant 1h à TP. Après, 5 lavages de 5 minutes avec du TBS-T ont été effectués et la révélation s'est faite avec du *ECL Clarity* (Biorad, # Cat 1705060) ou avec du *Luminata Forte* (Millipore, # Cat WBLUF0100) pour les protéines pour lesquelles le signal obtenu était plus faible. Suite à cela, les anticorps ont été retirés de la membrane suite à une incubation de 10 minutes à TP dans la solution *Reblot Plus Strong* (Millipore, # Cat 2504) pour évaluer ensuite évaluer l'expression des gènes rapporteurs GAPDH (fraction cytosolique) et pan-cadhérine (fraction membranaire). L'intensité de signal des bandes a été captée avec l'aide de l'appareil *ChemiDoc MP Imaging System* (Biorad, # Cat 17001402) et l'analyse de dosage densitométrique subséquente a été faite avec le logiciel *Image Lab 5.2*.

À noter que des tableaux des conditions et des anticorps utilisés pour ce projet sont présentés à la section 2.4.5.

2.4.4 Extraction des protéines totales

Les cellules de la granulosa restantes ont été lysées avec du tampon RIPA froid dont la composition est décrite au tableau 6 auquel était ajouté des inhibiteurs de phosphatases *PhosSTOP* (Roche, # Cat 4906845001) et de protéases *Complete Mini* (Roche, # Cat 11836153001).

Tableau 6 : Composition du tampon RIPA utilisé pour la lyse cellulaire

Ingrédient	Concentration finale
Triton	1 %
Tris-HCL pH 7,4	50 mM
NaCl	150 mM
SDS	0,1 %
Sodium désoxycholate	0,5 %

Après 20 minutes d'incubation sur glace dans le tampon RIPA, le lysat protéique a été centrifugé à 13 000 RPM durant 10 minutes. Le surnageant a été transféré dans un Eppendorf 0,5 mL et congelé à -80 °C jusqu'à ce qu'il soit dosé selon la méthode décrite à la section suivante.

2.4.5 Dosage protéique et buvardage de type Western des échantillons protéiques totaux

Les échantillons de protéines totales de cellules de la granulosa ont été dosés avec le kit *DC protein assay* (Biorad, # Cat 5000116) et une courbe standard de BSA allant de 0 à 2,8 µg/µL a été utilisée afin de déterminer la concentration protéique des échantillons. La lecture de l'absorbance des puits a été faite avec un lecteur de plaques (Infinite M200, Tecan) à la longueur d'onde recommandée par le fabricant.

L'buvardage de type Western a été réalisé avec le protocole décrit à la section 2.4.3 en utilisant entre 40 et 60 µg de protéines totales. Les détails des conditions et des anticorps utilisés sont décrits dans les tableaux ci-dessous. Par ailleurs, afin d'évaluer l'expression du gène rapporteur GAPDH dans nos échantillons et de corriger nos protéines d'intérêt par la quantité de protéines mise sur le gel, les anticorps ont été retirés des membranes en les incubant 10 minutes à TP dans la solution *Reblot Plus Strong* (Millipore, # Cat 2504). Par la suite, elles ont été lavées 10 minutes dans du TBS-T avant de procéder à l'étape de blocage tel que décrit dans la section 2.4.3.

Tableau 7 : Récapitulatif des conditions et anticorps primaires utilisés pour les buvardages de type Western du projet 1

Échantillon protéique	Anticorps primaire, dilution	Solution d'incubation	Solution de révélation	Compagnie, # Catalogue
Fractions cytosoliques et membranaires	PKC α , 1/1000	Lait 5 %, 2h, TP	ECL	Santa Cruz, sc-208
	PKC δ , 1/1000	Lait 5 %, 2h, TP	Luminata Forte	Cell signaling, 2058
	PKC ε , 1/1000	Lait 5 %, 2h, TP	Luminata Forte	Santa Cruz, sc-214
Fraction membranaire	Pan- cadhérine, 1/500	TBS-T, O/N, 4°C	Luminata Forte	Santa Cruz, sc-1499
Fraction cytosolique et protéines totales	GAPDH-HRP, 1/1000	Lait 5 %, 2h, TP	ECL	Santa Cruz, sc-20357
Protéines totales	p-p38, 1/1000	Lait 5 %, 2h, TP	ECL	Cell signaling
	p-JNK, 1/1000	TBS-T, 2h, TP	Luminata Forte	Santa Cruz, sc-6244
	p-Akt, 1/1000	Lait 5 %, 2h, TP	Luminata Forte	Cell signaling, 9272S

Tableau 8 : Anticorps secondaires utilisés pour les buvardages de type Western du projet 1

Anticorps secondaire	Solution d'incubation	Dilution	Compagnie, # Catalogue
Anti-rabbit HRP	p-Akt : Lait 5 %, 2h, TP	p-Akt : 1/2000	GE Healthcare, NA934-1ML
	Autres : Lait 5 %, 1h, TP	p-p38 : 1/5000	
		PKC : 1/10000	
Anti-mouse HRP	Lait 5 %, 2h, TP	p-JNK : 1/2000	Cell signaling, 7076
Anti-goat HRP	Lait 5 %, 2h, TP	Pan-cadhérine : 1/2000	Santa Cruz, sc-2352

2.5 Dosages des échantillons de sang et de liquide folliculaire

2.5.1 Dosage des AGNE et des TG

Les AGNE et les TG présents dans le liquide folliculaire et le plasma des participantes ont été mesurés par dosage colorimétrique (Wako Diagnostics). Les limites de détection du dosage d'AGNE étaient de 0,01 à 4,00 mEq/L tandis que ceux des TG étaient de 1,1 à 2 000 mg/dL. La lecture de l'absorbance des puits a été réalisée comme énoncé à la section 2.4.5.

2.5.3 Dosage de l'estradiol, de la progestérone et de la testostérone totale

Les dosages d'estradiol, de progestérone et de testostérone totale dans le liquide folliculaire et les échantillons de sérum ont été réalisés par ELISA commerciaux (Diagnostics Biochem Canada). Les limites de détections des dosages ELISA sont indiquées dans le tableau 9. La mesure de l'absorbance des puits a été faite tel que décrit dans la section 2.4.5.

Tableau 9 : Limites de détection des dosages ELISA d'estradiol, de progestérone et de testostérone totale

Analyte	Limites de détection (ng/mL)
Estradiol	0,02 à 3,2
Progestérone	0,3 à 60
Testostérone totale	0,08 à 16,7

2.6 Présentation des résultats

Les résultats des dosages sont présentés en valeur brute et en ratio de ces valeurs. Concernant les données d'ubiquitination de type Western, les résultats d'expression protéique de chaque patiente ont été rapportés à un contrôle. Cet échantillon contrôle était un extrait de protéines totales d'une lignée cellulaire de cellules de la granulosa humaines, les KGN. Avant leur récolte, celles-ci ont été stimulées 30 minutes à 0,1 μ M de PMA afin d'induire une activation des PKC. À noter que le même extrait protéique a été déposé sur chacun des gels de polyacrylamide de ce projet pour mesurer l'expression de nos protéines d'intérêt afin de servir de contrôle. Cette méthode d'analyse permet de pouvoir comparer plusieurs échantillons qui n'ont pas été migrés sur un même gel lors des expériences et d'assurer une reproductibilité des résultats.

2.7 Analyses statistiques

Les statistiques présentées dans ce mémoire ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism 7. Les données des tableaux et des graphiques sont présentées en médiane avec écart interquartiles. Afin de comparer les groupes de participantes, le test statistique non-paramétrique Mann-Whitney a été utilisé et les corrélations ont été analysées selon la corrélation de Spearman. Le test de Khi-deux de Pearson a été utilisé pour analyser les variables catégorielles. Le seuil de significativité pour ce projet a été établi à $P < 0,05$.

MATÉRIEL ET MÉTHODES (PROJET 2)

3.1 Culture cellulaire

3.1.1 NCI-H295R

Les cellules NCI-H295R proviennent d'une lignée cellulaire issue d'un carcinome du cortex surrénalien humain sécrétant des stéroïdes, ce qui en fait un modèle de choix pour l'étude de l'androgénèse *in vitro* (Gazdar *et al.* 1990).

Les cellules ont proliféré dans un T75 dans du milieu DMEM-F12 (sérum de veau cosmique 10 %, L-Glutamine 365,10 mg/L, HEPES 9,4 mM, pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL, gentamicine 0,05 g/L, NaHCO₃ 0,1 %, insuline 0,00625 mg/mL, transferrine 0,00625 mg/mL et sélénite 6,25 ng/mL) jusqu'à l'atteinte d'une confluence de 90 %. À ce moment, le milieu de culture a été jeté et le T75 a été lavé avec 10 mL de PBS pour retirer toute trace du milieu DMEM-F12. Un volume de 2 mL d'une solution de trypsine (trypsine 0,25 % et EDTA 1 %) a été ajouté au T75 et les cellules ont été incubées 3 minutes à 37 °C ou jusqu'à ce qu'elles ne soient plus adhérentes. Un volume de 10 mL de milieu DMEM-F12 a été ajouté au T75 et le milieu a été centrifugé durant 7 minutes à 125 g afin de récupérer les NCI-H295R. En vue de réaliser les expériences de stimulation, les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 12 puits (200 000 cellules par puits) ou de 24 puits (100 000 cellules par puits) dans du milieu DMEM-F12. Le lendemain, le milieu a été changé pour du milieu de stimulation pauvre en sérum (DMEM-F12 ; sérum de veau cosmique 0,01 %, L-Glutamine 365,10 mg/L, HEPES 9,4 mM, pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL et gentamicine 0,05 g/L). Après 24 h, le milieu a été changé de nouveau et la stimulation cellulaire a débuté selon le protocole décrit à la section 3.2.

3.1.2 Cellules surrénaliennes humaines

Pour ce projet, nous avons eu accès à des glandes surrénales humaines grâce à notre partenariat avec Transplant Québec. Ces glandes étaient prélevées dans le cadre d'une procédure de don d'organes au CIUSS de l'Estrie-CHUS. Les organes ont été conservés dans du milieu OPTI-MEM jusqu'à ce qu'ils soient récupérés par un membre du laboratoire après la chirurgie. Les glandes surrénales qui ont été endommagées ou coupées durant le prélèvement par le chirurgien ne permettaient pas une isolation appropriée des cellules et n'ont pas été utilisées pour réaliser le protocole d'isolation cellulaire.

Après avoir retiré la couche graisseuse autour des glandes surrénales, un microtome *Stadie-Riggs* (Thomas Scientific, # Cat 6727C10) a été utilisé afin d'obtenir des couches de cellules fasciculées et réticulées. Celles-ci ont été déposées dans du milieu MEM (HEPES 8 mM, pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL, L-Glutamine 2 mM et NaHCO₃ 0,01 %) pour la durée du protocole d'isolation cellulaire. À l'aide d'un scalpel, des morceaux de 1 mm³ ont été coupés à partir des tranches préalablement obtenues. Ceux-ci ont été déposés dans un Falcon 50 mL contenant 17 mL du milieu MEM préalablement décrit.

Une première digestion cellulaire a été effectuée en ajoutant de la collagénase de type 1 (500 U/mL) et de la DNase de type 1 (160 U/mL), puis en laissant l'échantillon à 37 °C durant 30 minutes. Suite à cette étape, l'échantillon a été filtré avec un filtre de 100 µm et centrifugé durant 10 minutes à 83 g, tandis que les cellules non digérées ont subi une 2^e digestion à la collagénase. Après la centrifugation, le culot contenant les cellules fasciculées et réticulées a été resuspendu dans 5 mL de milieu MEM et conservé sur glace. Une 3^e digestion a été effectuée selon les mêmes conditions et les culots obtenus suite aux 3 centrifugations ont été mis dans le même Falcon 50 mL et ce dernier a été centrifugé durant 10 minutes à 83 g. Les cellules ont été resuspendues dans du milieu OPTI-MEM (sérum de veau fœtal 2 %, HEPES 8 mM, pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL, L-Glutamine 2 mM et NaHCO₃ 0,01 %) etensemencées dans une plaque de 6 puits à une densité de 600 000 cellules par puit dans 2 mL de milieu OPTI-MEM. Le lendemain, le milieu de culture a été changé afin de se

débarrasser des cellules n'ayant pas adhérees au fond du puit et le protocole de stimulation cellulaire a été débuté.

3.2 Stimulation cellulaire à la Fsk et à l'oléate

Les cellules NCI-H295R ainsi que les cellules surrénaliennes humaines en culture primaire ont été stimulées durant une période de 48 h. Comme expliqué précédemment, le milieu de culture a été changé le matin du début de la stimulation et de la Fsk 10 μM a été ajoutée au milieu de culture (1x/48h) pour les conditions Fsk et Fsk + Oléate, tandis que du DMSO a été ajouté pour la condition contrôle. L'utilisation de la Fsk permet l'activation de l'adénylate cyclase et la formation d'AMPc, de la même manière que le fait l'ACTH afin de produire des androgènes. Aussi, les cellules ont été exposées à 200 μM d'oléate (4x/48h) couplé au BSA selon un ratio 5:1. Les conditions sans oléate ont été exposées à du BSA seulement. À noter que la concentration d'oléate choisie pour ce projet a été déterminée suite à des expériences faites par des anciens membres du laboratoire, qui ont démontrées que 200 μM d'oléate était adéquat afin d'induire une augmentation de la production d'androgènes sans causer d'apoptose chez les cellules surrénaliennes.

3.3 Récolte des cellules

Après les 48 h de stimulation, le milieu de culture des NCI-H295R et des cellules surrénaliennes humaines a été prélevé et congelé à -80 °C jusqu'au moment du dosage de DHEA. Pour l'extraction des protéines, du PBS froid a été ajouté dans les plaques déposées sur glace pour retirer le surplus de milieu de culture. Après le retrait du PBS, la solution de lyse RIPA décrite au tableau 6 a été ajoutée dans chacun des puits à raison de 120 μL /puits (plaque de 6 puits), 60 μL /puits (plaque de 12 puits) ou 40 μL /puits (plaque de 24 puits). Afin de s'assurer de la lyse cellulaire, une incubation de 20 minutes sur glace a été faite et les puits ont été grattés avec un grattoir, puis les échantillons protéiques ont été transférés dans un Eppendorf 0,5 mL. Les tubes ont été centrifugés à 4 °C durant 15 minutes à une vitesse de 13 000 RPM. Le surnageant ainsi obtenu a été transféré dans un autre microtube qui a été conservé à -80 °C jusqu'au moment des expérimentations.

3.4 Dosages

3.4.1 Dosage du DHEA dans le milieu de culture

Dans les milieux de culture obtenus suite à la stimulation cellulaire, le DHEA a été dosé par un ELISA commercial (Diagnostics Biochem Canada). La limite de détection du kit était de 0,082 ng/mL. La mesure de l'absorbance des puits s'est faite à une longueur d'onde de 450 nm comme recommandé par le fabricant.

3.4.2 Dosage protéique

Les extraits protéiques des NCI-H295R et des cellules surrénaliennes humaines ont été dosés avec le kit *DC protein assay* (Biorad, # Cat 5000116) selon la méthode décrite à la section 2.4.5.

3.5 Buvardages de type Western

Pour ce projet, les buvardages ont été réalisés selon le protocole détaillé à la section 2.4.3 en utilisant 20 µg (cellules surrénaliennes humaines) ou 25 µg (NCI-H295R) de protéines. Après le transfert, les membranes ont été colorées dans une solution de Ponceau S durant 1 minute et une image de la membrane a été prise avec l'appareil *ChemiDoc MP Imaging System* (Biorad, # Cat 17001402) afin de pouvoir corriger l'expression protéique de la P450c17 par la quantité de protéines présente sur la membrane. Ensuite, les membranes ont été rincées dans du TBS-T et les buvardages ont été faits. Les anticorps utilisés pour ce projet sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 10 : Récapitulatif des conditions et anticorps utilisés pour les buvardages de type Western du projet 2

Anticorps primaire			
Anticorps, dilution	Solution d'incubation	Solution de révélation	Compagnie, # Catalogue
P450c17, anti-mouse 1/800	Lait 5 %, 2h, TP	ECL	Santa Cruz, sc-374244
p-ERK1/2, anti-rabbit 1/2 000	Lait 5 %, 2h, TP	ECL	Cell signaling, 4370
ERK1/2 total, anti-rabbit 1/2 000	Lait 5 %, 2h, TP	ECL	Cell signaling, 4695
Anticorps secondaires			
Anticorps, dilution	Solution d'incubation	Compagnie, # Catalogue	
Anti-rabbit HRP, 1/15 000	Lait 5 %, 1h, TP	GE Healthcare, NA934-1ML	
Anti-mouse HRP, 1/10 000	Lait 5 %, 1h, TP	Cell signaling, 7076	

3.6 Analyses de l'expression génique des NCI-H295R

3.6.1 Extraction de l'ARNm

Des cellules NCI-H295R ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits à une densité de 600 000 cellules/puits et ont été exposées à l'oléate tel que décrit à la section 3.2. Suite aux 48h de stimulation, le milieu de culture a été retiré et l'extraction de l'ARNm a débuté par l'ajout de 1 ml de *TRIzol* (ThermoFisher, # Cat 15596026) par puits. Le tout a été laissé à TP durant 5 minutes afin que les cellules soient bien lysées. Ensuite, les échantillons ont été transférés dans des tubes 1,5 mL et 0,2 mL de chloroforme y ont été ajouté. Les tubes ont été

secouées durant 15 secondes et laissés à TP durant 15 minutes. Après, les échantillons ont été centrifugés à 4 °C durant 15 minutes à une vitesse de 12 000 g et la phase aqueuse contenant l'ARN a été transférée dans un autre tube stérile. La précipitation de l'ARN a été réalisée en ajoutant 0,5 mL d'isopropanol et en laissant l'échantillon durant 10 minutes à TP. Par la suite, les tubes ont été centrifugés à 4 °C durant 15 minutes à 12 000 g et le surnageant obtenu a été jeté. Le culot a été resuspendu dans 1 mL d'éthanol 75% conservé à -20 °C et les échantillons ont été centrifugés à 4 °C durant 5 minutes à 7 500 g. Finalement, le surnageant a été jeté et le culot a séché à l'air libre durant 3 minutes afin de s'assurer qu'il ne reste plus d'éthanol. Celui-ci a ensuite été resuspendu dans 10 µl d'eau *RNase-Free* (Qiagen, # Cat 129112) et l'ARNm a été dosé avec le *NanoDrop 2000* (ThermoFisher) puis congelé à -80°C jusqu'à son utilisation.

3.6.2 RT-qPCR

Étant donné que nous avons peu d'échantillons à analyser et que c'était un projet exploratoire, nous avons collaboré avec la plateforme Rnominique de l'Université de Sherbrooke pour la réalisation du RT-qPCR chez les cellules NCI-H295R. Les séquences des amorces utilisés pour les gènes CYP17A1, HSD3B2, CYB5A et CYPOR sont retrouvés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 11 : Séquences forward et reverse des amorces utilisées pour le qPCR chez les cellules NCI-H295R

Gène	Séquence	
	Forward	Reverse
CYP17A1	GGCAAGGACTTCTCTGGGCGG	CCTTGAACAGGGCAAAGGTGGC
HSD3B2	GTCGTCATCCACACCGCCTGTA	TGGACACAGGCCTCCAACAGT
CYB5A	CACAACCACAGCAAGAGCACCT	CCCTTAAAACTTCTTCCCCACCAGG
CYPOR	TGATTCTGTTTTCGCTCATCGTGGG	CCACAAAGCTGCTCTCTCTGACAG

3.7 Présentation des résultats

Suite aux différentes expérimentations, des facteurs de correction ont été utilisés avant l'analyse des résultats. La production de DHEA a été normalisée par la quantité de protéines retrouvées dans chaque puit et les résultats d'expression protéique de la P450c17 par buvardage de type Western ont été corrigés par la quantité de protéines sur la membrane visualisée par le rouge ponceau, au niveau de la bande à 60 kD. Quant à elle, l'évaluation de la phosphorylation de ERK a été corrigée par la protéine ERK totale.

3.8 Analyses statistiques

Comme les expériences ont été réalisées en triplicata (duplicata pour l'expression génique des NCI-H295R), une moyenne de chacune a été faite et les résultats sont présentés en moyenne de pourcentage d'augmentation \pm SEM par rapport à la condition Fsk qui a été fixée à 100 %. Comme la moyenne des données pour la condition Fsk est de 100%, il n'y a donc pas de barre d'erreur SEM pour ces résultats. Des tests de Wilcoxon à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7 ont été faits pour analyser les données des différentes expériences. Tout comme pour le projet 1, les résultats ont été considérés comme étant significatifs lorsque $P < 0,05$.

RÉSULTATS (PROJET 1)

4.1. Caractéristiques des patientes recrutées

Au cours de la période de recrutement dans les 3 cliniques de fertilité, 27 patientes en processus de FIV ont accepté de participer à l'étude. Aucune patiente n'a dû être retiré du projet en raison de la découverte ultérieure d'un facteur d'exclusion, de sorte qu'elles sont toutes incluses dans les analyses.

Comme mentionné précédemment, les participantes ont été séparées en 2 groupes selon leur niveau d'AGNE+TG dans le liquide folliculaire par rapport aux autres patientes recrutées : $<50^{\text{e}}$ percentile (n=13) pour le premier groupe et $\geq 50^{\text{e}}$ percentile (n=14) pour le second groupe.

4.1.2 Mesures anthropométriques et caractéristiques cliniques

Plusieurs variables anthropométriques ont été comparées entre nos 2 groupes de participantes. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative quant aux caractéristiques suivantes : âge, poids, taille, IMC et tour de taille, mais on peut noter que les femmes avec des gras folliculaires $\geq 50^{\text{e}}$ percentile étaient plus âgées et avaient un plus grand tour de taille. Les données sont détaillées dans le tableau 12.

Par ailleurs, les informations fournies par les patientes et celles trouvées dans les dossiers médicaux nous ont permis de comparer plusieurs paramètres cliniques (tableau 12). Il n'y avait pas de différences statistiquement significatives entre les groupes concernant les caractéristiques souvent vus en SOPK, mais on note un peu plus d'hyperandrogénie clinique et de dysfonction ovarienne dans le groupe avec gras folliculaires $\geq 50^{\text{e}}$ percentile. De plus, nous avons noté la prise de metformine chez nos participants afin de comparer les groupes pour ce facteur de confusion potentiel. Des 27 patientes recrutées, seulement 1 prenait cet hypoglycémiant oral, de sorte que nous ne croyons pas que ceci ait influencé les données obtenues dans ce projet. Finalement, dans chacun des groupes, 1 patiente avait reçu un

diagnostic de SOPK par son médecin traitant ($P = 0,96$). Comme on sait que cette condition ne figure pas toujours dans les dossiers médicaux, nous avons convenu d'établir nos propres critères basés sur ceux d'AE-PCOS afin d'éviter un sous-diagnostic dans le projet. Le premier critère était la présence de signes d'hyperandrogénie clinique et d'ovaires polykystiques, tandis que le 2^e critère demandait la présence d'hyperandrogénie clinique additionnée d'anovulation chronique. De ce fait, nous avons pu déterminer que 2 patientes dans chaque groupe avaient un SOPK selon nos critères ($P = 0,94$).

Tableau 12 : Comparaison des mesures anthropométriques et des caractéristiques cliniques des patientes recrutées

Paramètre	< 50 ^e percentile n = 13	≥ 50 ^e percentile n = 14	Valeur <i>P</i>
<i>Mesures anthropométriques</i>			
Âge	31,0 [31,0-36,0]	36,0 [31,5-36,5]	0,08
Poids (kg)	56,8 [54,6-64,3]	61,1 [56,1-85,3]	0,41
Taille (cm)	169 [161-173]	166 [161-170]	0,42
IMC (kg/m ²)	21,1 [19,6-22,7]	22,6 [20,3-28,6]	0,24
Tour de taille (cm)	72,0 [69,3-79,3]	78,1 [74,3-92,5] n = 13	0,07
<i>Caractéristiques cliniques</i>			
Hyperandrogénie clinique (acnée et/ou alopécie et/ou hirsutisme), n %	4 (31 %)	7 (50 %)	0,31
Ovaires polykystiques, n %	3 (23 %)	1 (7%)	0,24
Oligo-anovulation, n %	0 (0 %)	2 (14 %)	0,10
Prise de metformine, n %	1 (8 %)	0 (0%)	
Diagnostic de SOPK par le médecin traitant, n %	1 (8 %)	1 (7 %)	0,96
Diagnostic de SOPK dans ce projet, n %	2 (15 %)	2 (14%)	0,94

Cause d'infertilité			
Facteur tubaire ¹ , n %	0 (0 %)	3 (21 %)	0,22
Facteur mâle, n %	7 (54 %)	5 (36 %)	
Inexpliquée, n %	6 (46 %)	5 (36 %)	
Autre, n %	0 (0 %)	1 (7 %)	

4.1.3 Issues de fertilité

Afin d'évaluer l'impact d'une haute concentration de lipides dans le liquide folliculaire sur les issues de fertilité des patientes, plusieurs données cliniques retrouvées dans les dossiers médicaux ont été analysées (tableau 13). Entre nos 2 groupes de participantes, il n'y avait pas de différence statistiquement significative concernant le nombre d'ovules récoltés, le pourcentage d'ovules au stade MII, le pourcentage d'ovules fécondés et le pourcentage d'embryons au jour 3, mais on note une tendance pour un plus faible pourcentage de succès de la FIV au final. À noter que le nombre de participantes pour lesquelles nous avons des données quant au succès de la FIV est inférieur au nombre de patientes recrutées pour le projet, puisque ce ne sont pas toutes les participantes qui ont pu avoir un transfert d'embryon (ex. celles qui n'ont pas pu obtenir d'ovules fécondés).

Tableau 13 : Comparaison des issues de fertilité des patientes recrutées

Paramètre	n	< 50^e percentile	n	≥ 50^e percentile	Valeur <i>P</i>
Nombre d'ovules récoltés	13	14,0 [8,50-21,0]	14	12,0 [9,00-19,0]	0,64
% d'ovules au stade MII	13	85,7 [72,6-89,0]	11	77,8 [58,3-86,7]	0,34
% d'ovules fécondés	12	66,4 [34,4-82,2]	13	71,4 [51,9-82,5]	0,56
% d'embryons au jour 3	10	100 [100-100]	13	100 [92,5-100]	0,21
Succès de la FIV, n %	9	5 (56 %)	13	4 (29 %)	0,24

¹ Hydrosalpinx ou salpingectomie bilatérale.

4.2 Corrélations entre les niveaux d'AGNE et TG dans le sang et dans le liquide folliculaire

En plus de nous permettre de séparer nos groupes de participantes selon le niveau de lipides contenu dans leur liquide folliculaire, ces mesures d'AGNE et TG nous ont également permis d'effectuer des analyses de corrélation avec les dosages d'AGNE et TG sanguins (figure 7). Tel que déjà démontré dans la littérature (Jungheim *et al.* 2011), les niveaux d'AGNE retrouvés dans le liquide folliculaire étaient significativement corrélés avec ceux mesurés dans le plasma des participantes ($r = 0,40$. $P = 0,03$). Il en va de même pour les TG, c'est-à-dire qu'il y avait une corrélation positive et significative entre les TG du liquide folliculaire et du sang ($r = 0,50$. $P = 0,01$).

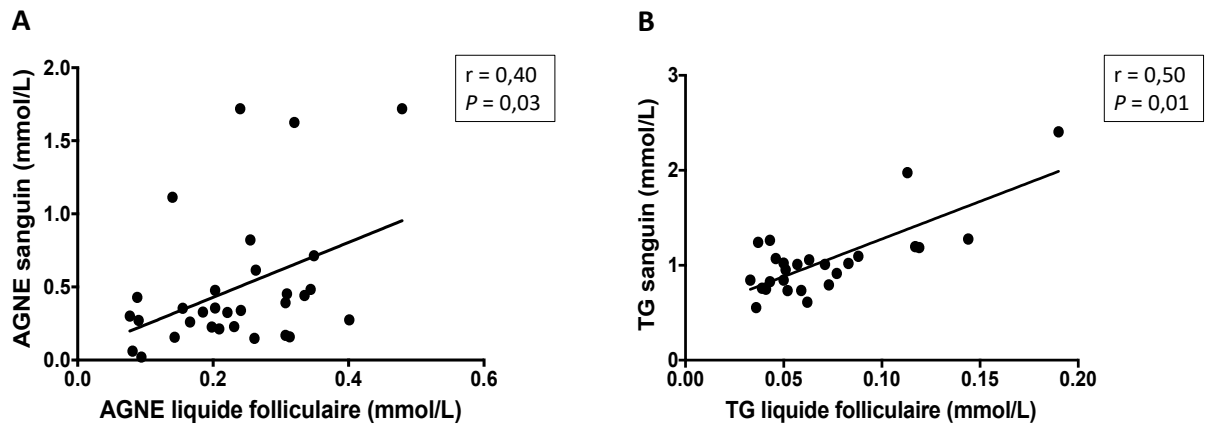


Figure 7 : Corrélations entre les niveaux d'AGNE et de TG séparés dans le sang et dans le liquide folliculaire

A) Les AGNE ont été dosés dans le sang et dans le liquide folliculaire récoltés le jour de la ponction d'ovules par une technique colorimétrique. Les résultats sont en mmol/L ($n = 26$).
B) Les TG ont été mesurés dans les mêmes échantillons par colorimétrie et les résultats sont également présentés en mmol/L ($n = 26$).

Après avoir additionné les valeurs d'AGNE et de TG du sang et du liquide folliculaire pour chaque participante, nous avons pu faire une analyse de corrélation avec ces variables additionnées (figure 8). Nous n'avons pas obtenu une corrélation significative entre les AGNE+TG du liquide folliculaire et les AGNE+TG du sang ($r = 0,28$. $P = 0,16$).

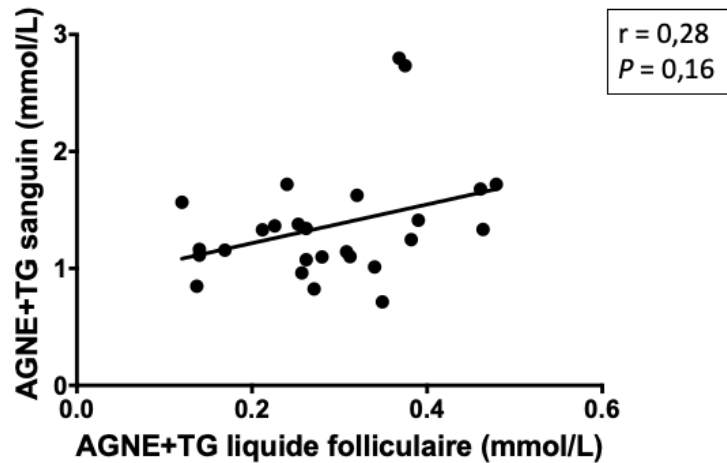


Figure 8 : Corrélation entre les AGNE+TG mesurés dans le sang et dans le liquide folliculaire

Les AGNE et les TG ont été dosés dans le sang et dans le liquide folliculaire par une technique colorimétrique. Les 2 valeurs obtenues ont été additionnées afin d'obtenir la variable AGNE+TG pour le sang et pour le liquide folliculaire. Les résultats sont en mmol/L (n = 26).

4.3 Niveaux de testostérone totale, d'estradiol et de progestérone du liquide folliculaire selon sa concentration en lipides

4.3.1 Dosage de testostérone totale dans le liquide folliculaire

La testostérone du liquide folliculaire a été dosée et nous avons comparé les résultats obtenus entre nos 2 groupes de participantes (figure 9). Tel qu'attendu, les niveaux de testostérone étaient plus élevés chez les patientes ayant des niveaux de lipides élevés dans leur liquide folliculaire, bien que ce résultat ne soit pas significatif (18,7 [16,4-26,4] nmol/L vs 16,0 [12,0-18,5] nmol/L. $P = 0,07$). Par contre, toujours dans le liquide folliculaire, la concentration de testostérone était significativement corrélée avec les niveaux d'AGNE+TG ($r = 0,49$. $P = 0,01$), ce qui reflète les résultats préalablement publiés par notre laboratoire (Gervais *et al.* 2015).

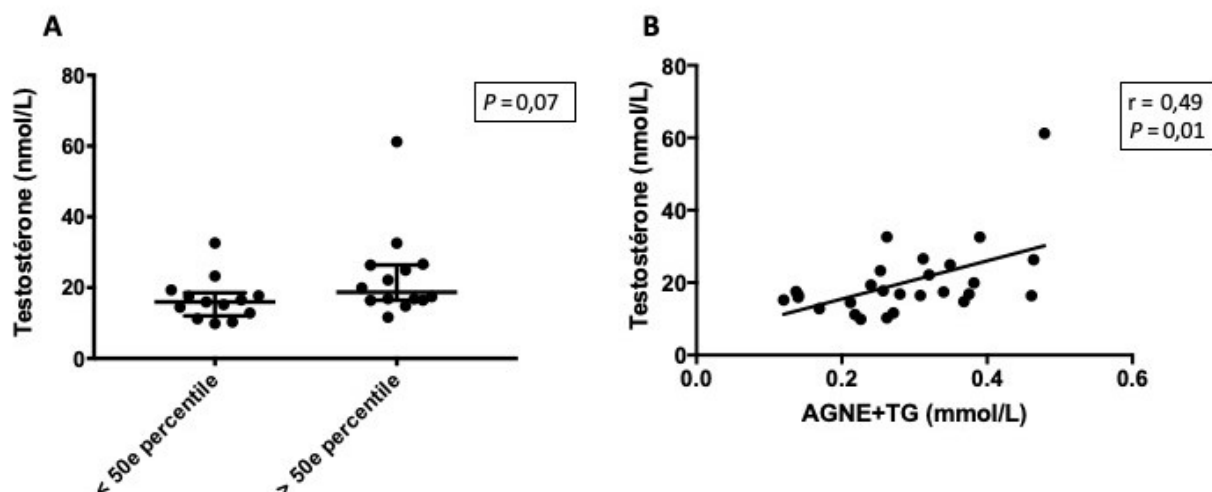


Figure 9 : Niveaux de testostérone totale du liquide folliculaire selon sa concentration de lipides

Dans le liquide folliculaire, la testostérone totale a été dosée par ELISA et les AGNE et TG par méthode colorimétrique. A) Les résultats sont divisés par groupe tel que préalablement expliqué : $< 50^{\text{e}}$ percentile ($n = 13$) et $\geq 50^{\text{e}}$ percentile ($n = 14$). La testostérone est en nmol/L. Les données sont présentées en médiane avec écart interquartile. B) La variable AGNE+TG est en mmol/L tandis que la testostérone est en nmol/L ($n = 27$).

4.3.2 Dosages d'estradiol et de progestérone dans le liquide folliculaire

Comme mentionné dans une section précédente, l'estradiol et la progestérone du liquide folliculaire ont été dosés. Nous avons par la suite comparé les résultats des dosages entre les patientes ayant peu ($< 50^{\text{e}}$ percentile) vs beaucoup ($\geq 50^{\text{e}}$ percentile) de lipides (AGNE+TG) dans leur liquide folliculaire (figure 10). Il est possible de constater que les patientes ayant plus d'AGNE+TG dans leur liquide folliculaire avaient également une production d'estradiol plus élevée que le groupe de patientes avec peu de gras dans leur environnement intra-ovarien (168,4 [134,0-200,6] nmol/L vs 103,2 [80,32-182,6] nmol/L. $P = 0,05$). Par ailleurs, il n'y avait pas de différence quant à la concentration de progestérone retrouvée dans le liquide folliculaire entre les groupes de participantes (5 074 [4 559-5 840] nmol/L vs 4 389 [2 902-6 685] nmol/L. $P = 0,30$). Dans ce sens, les lipides semblent avoir peu d'effet sur la production de progestérone par les cellules de la stéroïdogénèse ovarienne, contrairement à la synthèse d'estradiol.

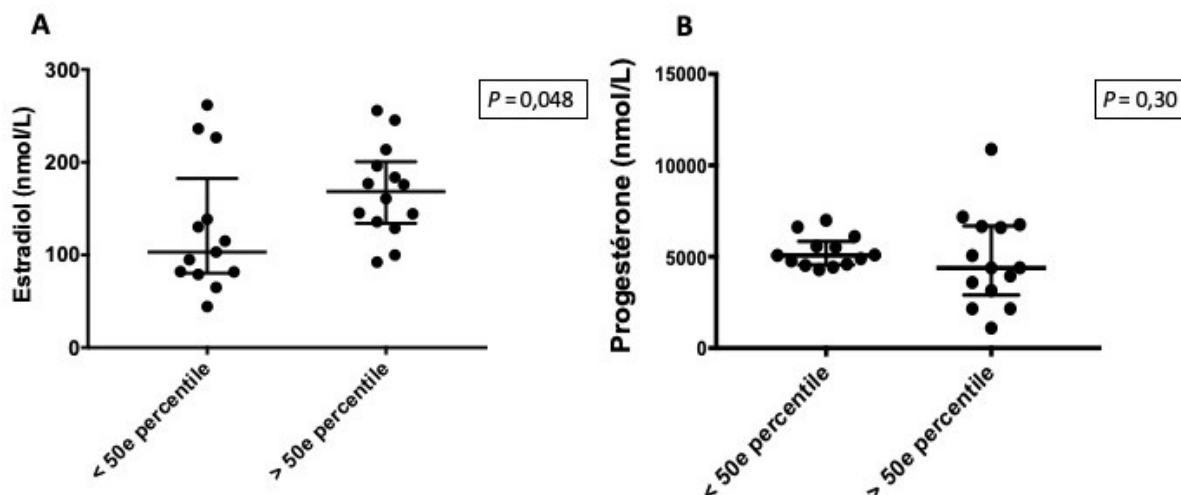


Figure 10 : Comparaison des niveaux d'estradiol et de progestérone du liquide folliculaire des 2 groupes de participantes

L'estradiol et la progestérone du liquide folliculaire ont été dosés par ELISA. Les résultats sont divisés par groupe de participantes tel que préalablement expliqué : < 50^e percentile (n = 13) et ≥ 50^e percentile (n = 14). Les données sont présentées en médiane avec écart interquartile. A) L'estradiol est présentée en nmol/L. B) La progestérone est présentée en nmol/L.

Afin d'évaluer le bon fonctionnement des cellules de la granulosa, le ratio estradiol/progestérone dans le liquide folliculaire a été calculé pour chacune des participantes. Comme on voit à la figure 11A, ce ratio est augmenté chez les patientes ayant des niveaux d'AGNE+TG supérieurs dans leur liquide folliculaire (,039 [0,026-0,050] vs 0,023 [0,014-0,030]. $P = 0,009$). Ce résultat est principalement dû à la synthèse augmentée d'estradiol chez ces participantes, puisque la concentration de progestérone n'est pas différente entre les groupes. Par ailleurs, l'analyse de Spearman entre le ratio estradiol/progestérone et les niveaux d'AGNE+TG du liquide folliculaire nous démontre une corrélation positive significative entre ces 2 variables (figure 11B, $r = 0,57$. $P = 0,002$).

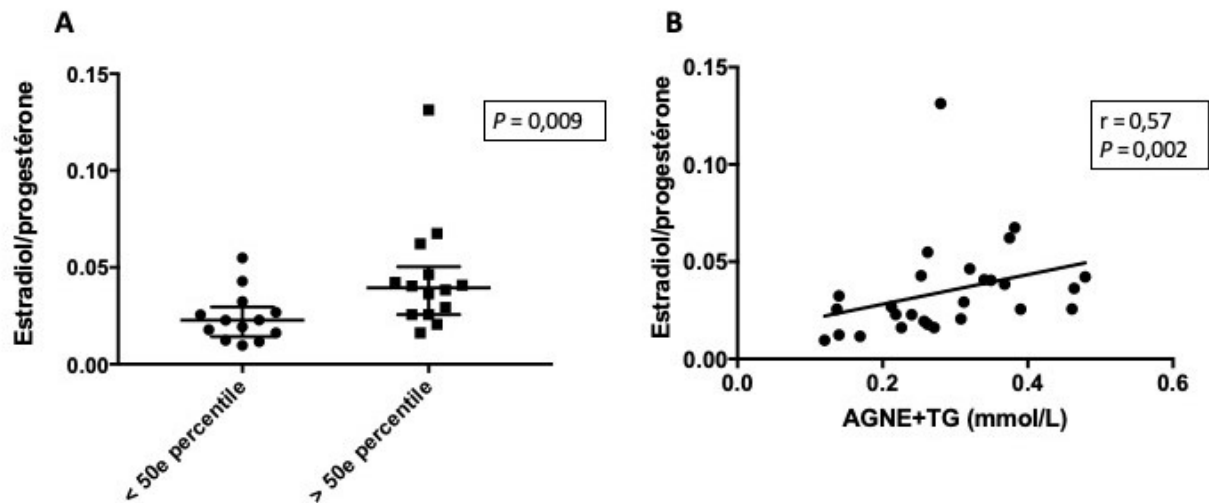


Figure 11 : Ratio estradiol/progestérone du liquide folliculaire selon sa concentration en lipides

Dans le liquide folliculaire, l'estradiol et la progestérone ont été dosés par ELISA et les AGNE et TG par méthode colorimétrique. A) Les résultats sont divisés par groupe : $< 50^{\text{e}}$ percentile ($n = 13$) et $\geq 50^{\text{e}}$ percentile ($n = 14$). Les données sont présentées en médiane avec écart interquartile. B) La variable AGNE+TG est en mmol/L tandis que le ratio estradiol/progestérone n'a pas d'unité ($n = 27$).

4.4 Corrélations entre les dosages effectués dans le liquide folliculaire et les paramètres cliniques des participantes

Afin de répondre au second objectif du projet de recherche, des corrélations entre les AGNE+TG ainsi que le ratio estradiol/progestérone du liquide folliculaire et différents paramètres cliniques ont été réalisées (tableau 14). Les AGNE+TG du liquide folliculaire n'étaient pas corrélés avec l'âge ($r = 0,37$. $P = 0,06$) et l'IMC ($r = 0,16$. $P = 0,43$), mais étaient presque significativement corrélés avec le tour de taille des participantes ($r = 0,38$. $P = 0,05$). Par ailleurs, les AGNE+TG n'étaient pas non plus corrélés avec les issues de fertilité, telles le nombre d'ovules récoltés ($r = -0,11$. $P = 0,58$), le % d'ovules au stade MII ($r = -0,21$. $P = 0,32$) et le % d'ovules fécondés ($r = 0,15$. $P = 0,48$).

Dans le même ordre d'idée, le ratio estradiol/progestérone mesuré dans le liquide folliculaire n'était pas corrélé avec les mesures anthropométriques comme l'âge ($r = 0,24$. $P = 0,23$),

l'IMC ($r = 0,02$. $P = 0,92$) et le tour de taille ($r = 0,21$. $P = 0,30$). Finalement, ce ratio de stéroïdes ne semblait pas avoir de corrélation avec le nombre d'ovules récoltés ($r = 0,08$. $P = 0,69$), le % d'ovules au stade MII ($r = -0,27$. $P = 0,21$) et le % d'ovules fécondés ($r = 0,26$. $P = 0,21$).

Tableau 14 : Corrélations entre les AGNE+TG, le ratio estradiol/progestérone du liquide folliculaire et les paramètres cliniques des participantes

Variable dépendante	Variable indépendante	n	r	P
Âge	AGNE + TG liquide folliculaire	27	0,37	0,06
IMC	AGNE + TG liquide folliculaire	27	0,16	0,43
Tour de taille	AGNE + TG liquide folliculaire	26	0,38	0,05
Nombre d'ovules récoltés	AGNE + TG liquide folliculaire	27	-0,11	0,58
% d'ovules au stade MII	AGNE + TG liquide folliculaire	24	-0,21	0,32
% d'ovules fécondés	AGNE + TG liquide folliculaire	25	0,15	0,48
Âge	Ratio estradiol/progestérone liquide folliculaire	27	0,24	0,23
IMC	Ratio estradiol/progestérone liquide folliculaire	27	0,02	0,92
Tour de taille	Ratio estradiol/progestérone liquide folliculaire	26	0,21	0,30
Nombre d'ovules récoltés	Ratio estradiol/progestérone liquide folliculaire	27	0,08	0,69
% d'ovules au stade MII	Ratio estradiol/progestérone liquide folliculaire	24	-0,27	0,21
% d'ovules fécondés	Ratio estradiol/progestérone liquide folliculaire	25	0,26	0,21

4.5 Niveaux de testostérone totale, d'estradiol et de progestérone du sang selon la concentration en lipides du liquide folliculaire

4.5.1 Dosage de testostérone totale dans le sang

La testostérone sérique des patientes recrutées a aussi été dosée et les valeurs des 2 groupes de participantes (< 50^e percentile d'AGNE+TG dans le liquide folliculaire et ≥ 50^e percentile) ont été comparées (figure 12). Contrairement à la testostérone mesurée dans le liquide folliculaire, celle dosée dans le sang n'était pas différente entre les groupes de patientes (11,7 [10,6-13,4] nmol/L vs 11,9 [8,86-14,8] nmol/L. $P = 0,70$).

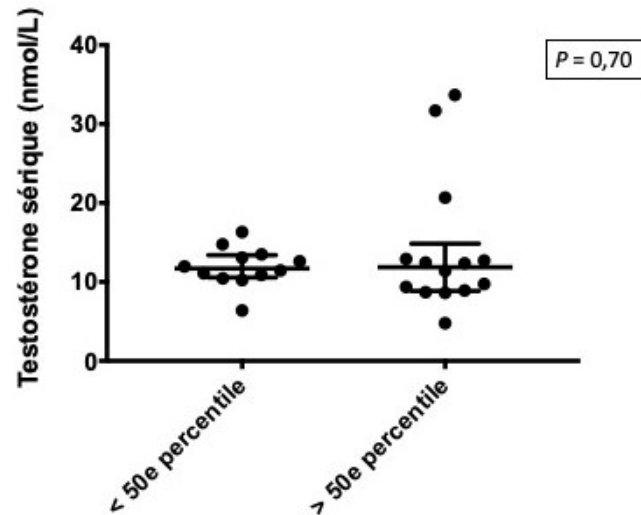


Figure 12 : Comparaison de la testostérone totale sérique entre les 2 groupes de participantes

Dans le sérum, la testostérone totale a été dosée par ELISA et les AGNE et TG du liquide folliculaire par méthode colorimétrique. Les résultats sont divisés par groupe tel que préalablement expliqué : < 50^e percentile (n = 12) et ≥ 50^e percentile (n = 14). La testostérone totale est en nmol/L. Les données sont présentées en médiane avec écart interquartile.

Une analyse de corrélation a également été effectuée entre la testostérone totale mesurée dans le sang et celle mesurée dans le liquide folliculaire (figure 13). Il est possible de constater une corrélation significative entre ces paramètres ($r = 0,49$. $P = 0,01$), contrairement à ce qui a été déjà rapporté dans la littérature (von Wolff *et al.* 2017).

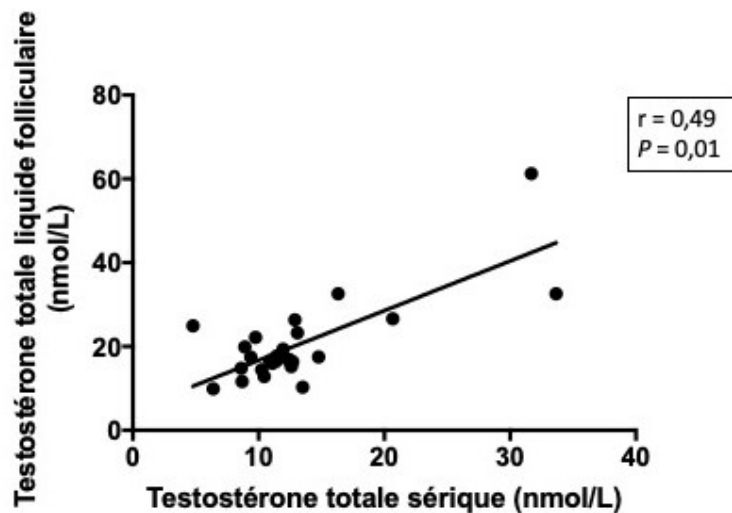


Figure 13 : Corrélations entre la testostérone totale dosée dans le sérum et dans le liquide folliculaire

Dans le sérum et dans le liquide folliculaire, la testostérone totale a été dosée par ELISA. Les résultats sont en nmol/L (n=26).

4.5.2 Dosages d'estradiol et de progestérone dans le sang

Comme mentionné dans une section précédente, l'estradiol et la progestérone ont été mesurés dans les échantillons de sérum et les données obtenues pour les 2 groupes de participantes ont été comparées. Comme on peut voir à la figure 14A, il n'y avait pas de différence quant à la concentration sanguine d'estradiol entre les femmes ayant des niveaux faibles vs élevés de lipides dans leur liquide folliculaire (0,201 [0,173-0,285] nmol/L vs 0,211 [0,181-0,285] nmol/L. $P = 0,70$). Il en va de même pour la progestérone sérique, qui n'était pas significativement différente entre les 2 groupes de patientes recrutées (2,82 [2,06-4,42] nmol/L vs 2,28 [1,50-3,76] nmol/L. $P = 0,46$).

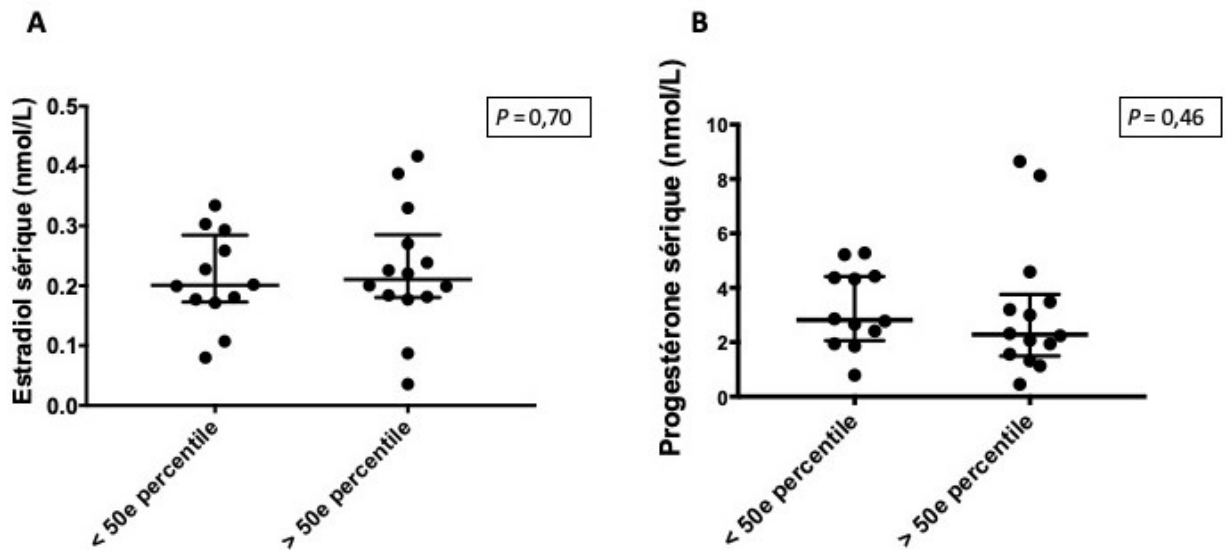


Figure 14 : Comparaison des niveaux d'estradiol et de progestérone sérique des 2 groupes de patientes

L'estradiol et la progestérone sérique ont été dosés par ELISA. Les résultats sont divisés par groupe de participantes : < 50^e percentile (n = 12) et ≥ 50^e percentile (n = 14). Les données sont présentées en médiane avec écart interquartile. A) L'estradiol est présentée en nmol/L. B) La progestérone est présentée en nmol/L.

Par ailleurs, tout comme dans le liquide folliculaire, le ratio estradiol/progestérone sanguin a également été calculé chez les participantes. Comme on le voit à la figure 15A, il n'y a pas de différence significative quant au ratio chez les 2 groupes (0,068 [0,44-0,095] vs 0,069 [0,051-0,13]. $P = 0,63$). De plus, une analyse de Spearman a été effectuée entre le ratio estradiol/progestérone et les niveaux de lipides sanguins (figure 15B). On peut constater que ces variables ne sont pas significativement corrélées dans notre population de patientes ($r = 0,21$. $P = 0,30$).

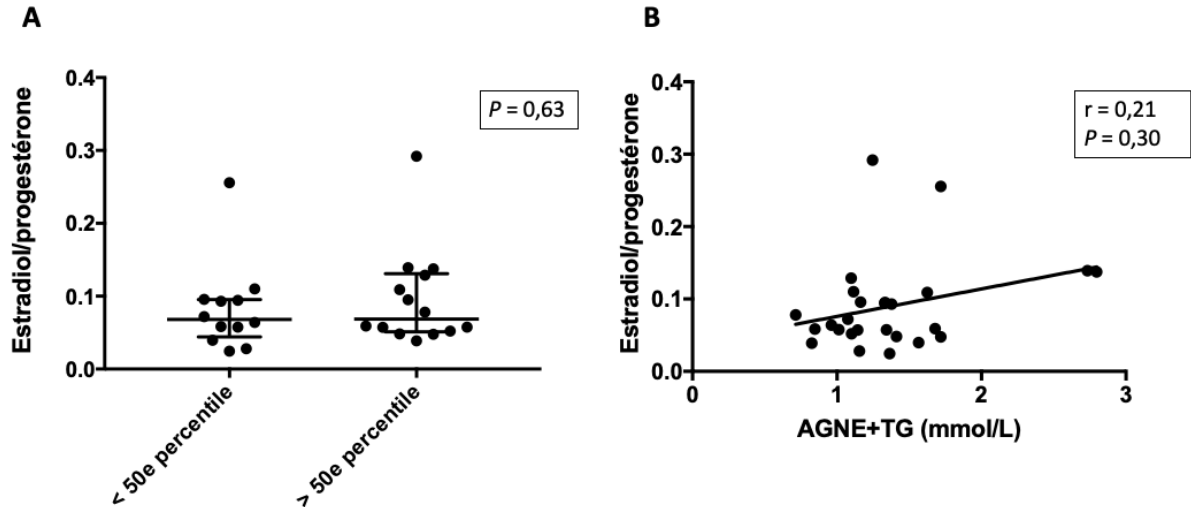


Figure 15 : Ratio estradiol/progestérone sérique selon la concentration en lipides dans le sang

Dans les échantillons sanguins, l'estradiol et la progestérone ont été dosés par ELISA et les AGNE et TG par méthode colorimétrique. Les données sont présentées en médiane avec écart interquartile. A) Les résultats sont divisés par groupe : < 50^e percentile (n = 12) et \geq 50^e percentile (n = 14). B) La variable AGNE+TG est en mmol/L tandis que le ratio estradiol/progesterone n'a pas d'unité (n = 26).

Afin de mesurer l'association entre le ratio estradiol/progesterone du liquide folliculaire et celui retrouvé dans le sang, une analyse de corrélation a été faite. Tel que démontré à la figure 16, les ratios mesurés dans le sérum ainsi que dans l'environnement intra-ovarien sont corrélés de manière statistiquement significative ($r = 0,59$. $P = 0,001$).

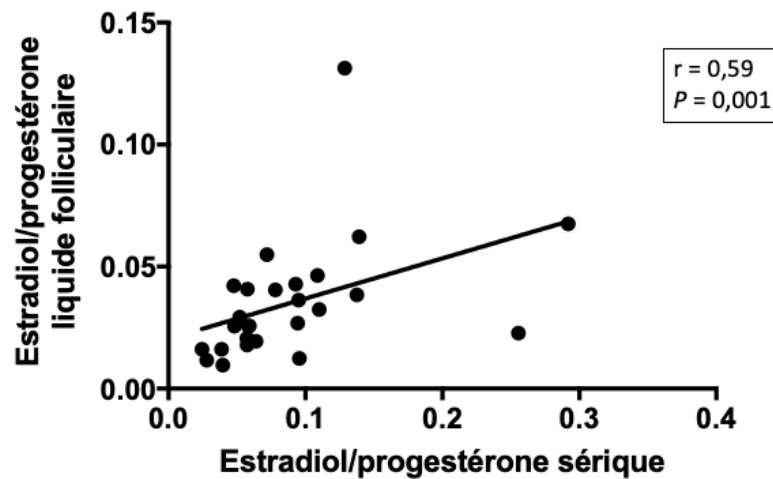


Figure 16 : Corrélation entre les ratios d'estradiol/progestérone sérique et ceux du liquide folliculaire

Dans le sérum et dans le liquide folliculaire, l'estradiol ainsi que la progestérone ont été dosés par ELISA.

4.6 Analyses protéiques des cellules de la granulosa humaines

4.6.1 Expression de PKC α , PKC ε et PKC δ dans les fractions cytosoliques et membranaires

Suite à la séparation des fractions cytosoliques et membranaires des cellules de la granulosa humaines, des buvardages de type Western a été réalisé afin de comparer l'expression des protéines PKC dans ces 2 compartiments cellulaires chez les patientes ayant des niveaux faibles vs élevés d'AGNE+TG dans leur liquide folliculaire. Tel que présenté à la figure 17A, l'expression de PKC α cytosolique semble augmentée chez les participantes ayant moins de lipides dans leur liquide folliculaire, bien que cette différence ne soit pas significative (2,022 [0,766-5,79] vs 0,934 [0,623-1,83]. $P = 0,22$). Quant à la fraction membranaire (figure 17B), il n'y a pas de différence entre les groupes à cause de la grande variabilité des résultats obtenus dans les échantillons (0,47 [0,16-1,12] vs 0,6419 [0,08-1,45]. $P = 0,84$). Nous avons également calculé le ratio d'expression de PKC α membranaire / cytosolique afin d'évaluer la proportion active de la kinase. Nos résultats démontrent que chez les femmes ayant de

hauts niveaux d'AGNE+TG dans leur environnement intra-ovarien, le ratio de PKC α membranaire / cytosolique est supérieur à celui des femmes avec des faibles taux de lipides (1,31 [1,13-2,00] vs 0,31 [0,57-0,72]. $P = 0,057$).

Les résultats de l'expression de la protéine PKC ε dans les fractions cellulaires sont présentés à la figure 17. Comme celle-ci semblait être peu exprimée dans nos échantillons, nous n'avons pu obtenir des résultats pour toutes les participantes, ce qui explique le faible N. Dans la fraction cytosolique (figure 17C), il n'y avait pas de différence quant à l'expression de PKC ε entre les groupes (0,267 [0,07-2,080] vs 0,46 [0,21-0,60]. $P = 0,99$). Aussi, un résultat semblable a été obtenu lors de l'analyse de l'expression de PKC ε dans la fraction membranaire (Figure 17D. 0,31 [0,25-0,45] vs 0,33 [0,17-0,98]. $P = 0,99$). À cause du trop petit nombre d'échantillons, nous n'avons calculé le ratio d'expression de PKC ε membranaire / cytosolique.

Concernant la protéine PKC δ , nous n'avons pas obtenu de résultat quant à son expression dans les cellules de la granulosa humaines. En fait, cette dernière était trop peu exprimée dans nos échantillons, de sorte que nous n'avons pas été en mesure de procéder aux analyses subséquentes.

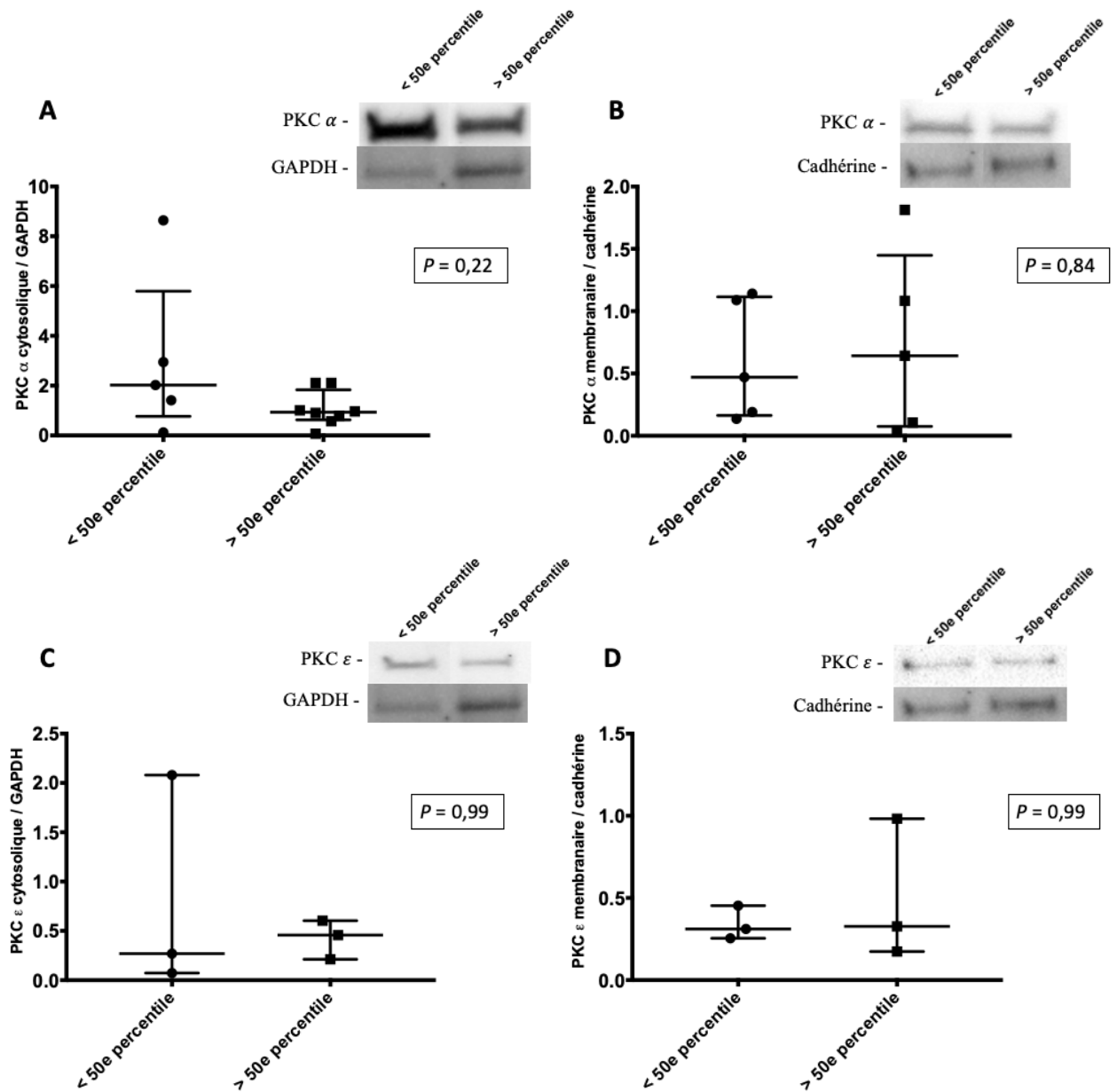


Figure 17 : Comparaison de l'expression des PKC α et PKC ε dans les fractions cytosoliques et membranaires des cellules de la granulosa humaines des 2 groupes de participantes

Les fractions cellulaires ont été séparées à l'aide d'un kit commercial tel que décrit précédemment. Ensuite, l'expression des différentes PKC a été évaluée par buvardage de type Western. Les données sont présentées en médiane avec écart interquartile. A) Niveau d'expression de PKC α dans la fraction cytosolique chez les groupes de participantes $< 50^{\text{e}}$ percentile (n = 5) et $\geq 50^{\text{e}}$ percentile (n = 8). B) Niveau d'expression de PKC α dans la fraction membranaire chez les groupes de participantes $< 50^{\text{e}}$ percentile (n = 5) et $\geq 50^{\text{e}}$ percentile (n = 5). C) Niveau d'expression de PKC ε dans la fraction cytosolique chez les groupes de participantes $< 50^{\text{e}}$ percentile (n = 3) et $\geq 50^{\text{e}}$ percentile (n = 3). D) Niveau

d'expression de PKC ϵ dans la fraction membranaire chez les groupes de participantes $< 50^{\text{e}}$ percentile ($n = 3$) et $\geq 50^{\text{e}}$ percentile ($n = 3$).

4.6.2 Expression de p-p38, p-JNK et p-Akt dans les extraits de protéines totales de cellules de la granulosa

Après la récolte des extraits de protéines totales des cellules de la granulosa, l'expression de p-p38 chez les 2 groupes de patientes a été mesurée et comparée grâce à la technique d'ubiquitination de type Western afin d'évaluer l'effet des lipides sur la signalisation cellulaire. À la figure 18, on remarque qu'il ne semble pas y avoir de différence quant à l'expression de p-p38 entre les femmes ayant des niveaux bas vs élevés de lipides dans leur liquide folliculaire (0,57 [0,18-1,41] vs 0,79 [0,39-3,2]. $P = 0,44$).

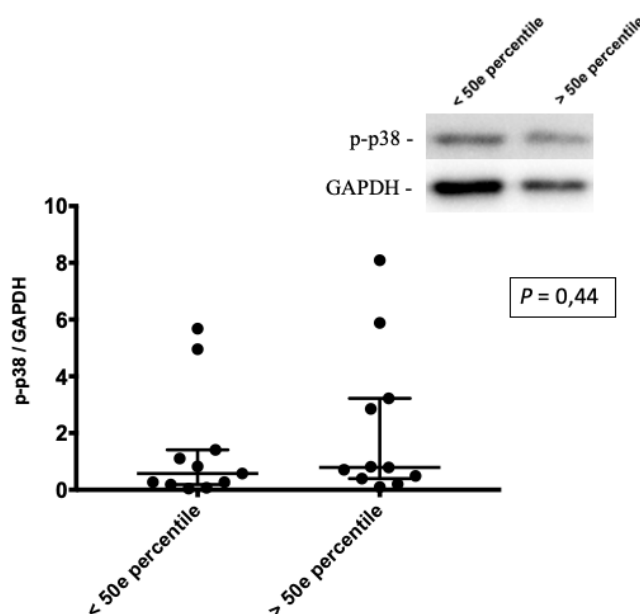


Figure 18 : Comparaison de l'expression de p-p38 dans des extraits de protéines totales de cellules de la granulosa chez les 2 groupes de participantes

Après l'extraction, les échantillons de protéines totales ont été analysés pour évaluer l'expression de p-p38 par ubiquitination de type Western chez les groupes de participantes $< 50^{\text{e}}$ percentile ($n = 11$) et $\geq 50^{\text{e}}$ percentile ($n = 11$). Les données sont présentées en médiane avec écart interquartile.

De plus, le même constat peut être établi à propos de la protéine p-JNK (figure 19). Les groupes de patientes étaient semblables quant à leur niveau d'expression de cette dernière (0,456 [0,22-0,85] vs 0,51 [0,15-3,2]. $P = 0,99$).

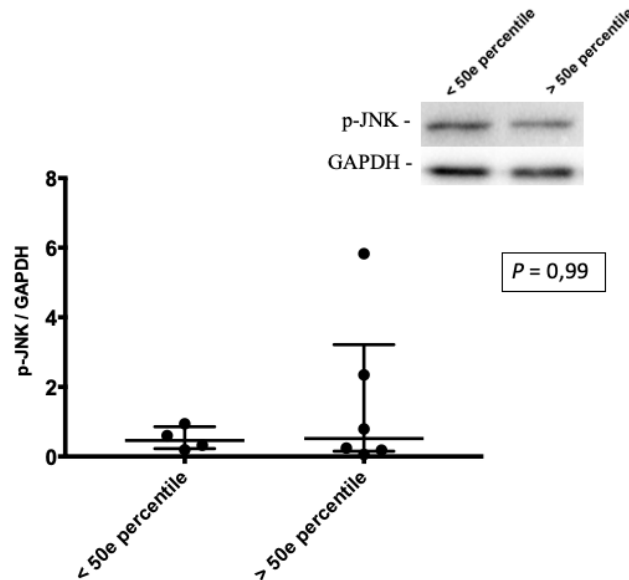


Figure 19 : Comparaison de l'expression de p-JNK dans des extraits de protéines totales de cellules de la granulosa chez les 2 groupes de participantes

Après l'extraction, les échantillons de protéines totales ont été analysés pour évaluer l'expression de p-JNK par buvardage de type Western chez les groupes de participantes < 50^e percentile (n = 4) et \geq 50^e percentile (n = 6). Les données sont présentées en médiane avec écart interquartile.

Concernant le résultat de p-Akt présenté à la figure 20, le faible N dans les 2 groupes peut être expliqué par le fait que cette protéine n'a pu être visualisée par buvardage de type Western que dans très peu de nos échantillons, probablement à cause qu'elle est faiblement exprimée. Dans les extraits que nous avons pu analyser, nous n'avons pas vu de différence significative quant à l'expression de p-Akt entre les femmes ayant des niveaux bas vs élevés de lipides dans leur liquide folliculaire (0,42 [0,20-2,5] vs 0,91 [0,54-0,93]. $P = 0,70$).

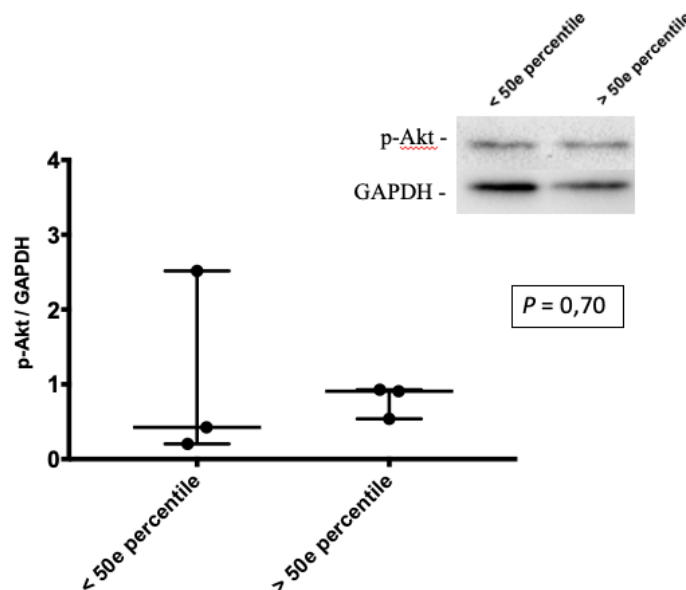


Figure 20 : Comparaison de l'expression de p-Akt dans des extraits de protéines totales de cellules de la granulosa chez les 2 groupes de participantes

Après l'extraction, les échantillons de protéines totales ont été analysés pour évaluer l'expression de p-Akt par buvardage de type Western chez les groupes de participantes < 50^e percentile (n = 3) et ≥ 50^e percentile (n = 3). Les données sont présentées en médiane avec écart interquartile.

4.7 Corrélations entre l'expression des protéines étudiées avec les niveaux de lipides du liquide folliculaire

Pour évaluer l'association entre l'expression des protéines impliquées dans la signalisation de l'insuline et les niveaux d'AGNE+TG du liquide folliculaire, des analyses de corrélations ont été effectuées (tableau 15). Le petit nombre d'échantillons analysés ne nous a pas permis de mettre en évidence des corrélations significatives entre les lipides du liquide folliculaire et l'expression des PKC activées, soit PKC α membranaire ($r = -0,27$. $P = 0,45$), le ratio PKC α membranaire / cytosolique ($r = 0,086$. $P = 0,92$) et PKC ε membranaire ($r = 0,09$. $P = 0,92$). Aussi, il ne semble pas y avoir de corrélation entre les niveaux d'AGNE+TG du liquide folliculaire et l'expression de p-p38 ($r = 0,05$. $P = 0,84$), de p-JNK ($r = -0,22$. $P = 0,54$) ainsi que p-Akt ($r = 0,26$. $P = 0,66$).

Tableau 15 : Corrélations entre l'expression des protéines analysées et les niveaux d'AGNE+TG du liquide folliculaire

Variable dépendante	Variable indépendante	n	r	P
PKC α membranaire	AGNE + TG liquide folliculaire	10	-0,27	0,45
Ratio PKC α membranaire / cytosolique	AGNE + TG liquide folliculaire	7	0,086	0,92
PKC ε membranaire	AGNE + TG liquide folliculaire	6	0,09	0,92
p-p38	AGNE + TG liquide folliculaire	22	0,05	0,84
p-JNK	AGNE + TG liquide folliculaire	10	-0,22	0,54
p-Akt	AGNE + TG liquide folliculaire	6	0,26	0,66

RÉSULTATS (PROJET 2)

5.1 Cellules NCI-H295R

5.1.1 Effet de 200 μ M d'oléate sur la synthèse de DHEA

Suite à la stimulation cellulaire par la Fsk et l'exposition à l'oléate décrites précédemment, le milieu de culture a été récolté afin de doser le DHEA, le principal androgène produit par la glande surrénale, et cette donnée a été rapportée par la quantité de protéines pour refléter le nombre de cellules de l'expérimentation. À la figure 21, on voit que les cellules traitées à 200 μ M d'oléate et à la Fsk avaient une production de DHEA supérieure de 49,1% par rapport à celles traitées à la Fsk seulement ($149,1\% \pm 10,32\%$ vs 100% . $P = 0,0007$).

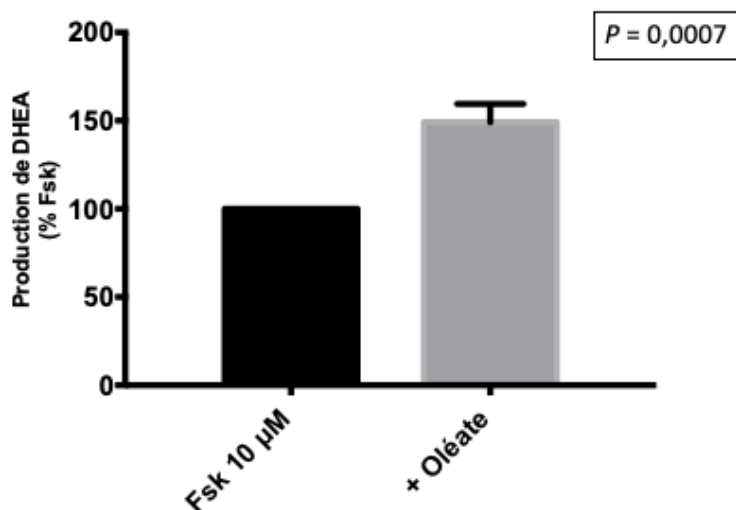


Figure 21 : Effet de 200 μ M d'oléate sur la production de DHEA chez des cellules NCI-H295R traitées à la Fsk

Les cellules ont été stimulées durant 48 h à 10 μ M de Fsk avec ou sans oléate. Le DHEA dans le milieu de culture a été dosé par ELISA et corrigé par la quantité de protéines. Les résultats de 17 expériences sont présentés en moyenne de % d'augmentation par rapport à la condition Fsk \pm SEM.

5.1.2 Effet de 200 μ M d'oléate sur l'expression protéique de la P450c17

L'impact de l'oléate sur l'expression protéique de la P450c17 a quant à elle été déterminée par buvardage de type Western. Bien que l'expression de cette enzyme des cellules traitées à l'oléate était nettement plus élevée que celles traitées à la Fsk ($176,4\% \pm 45,34\%$ vs 100% , $P = 0,744$), nous n'avons pu démontrer une différence statistiquement significative à cause de la variabilité des résultats.

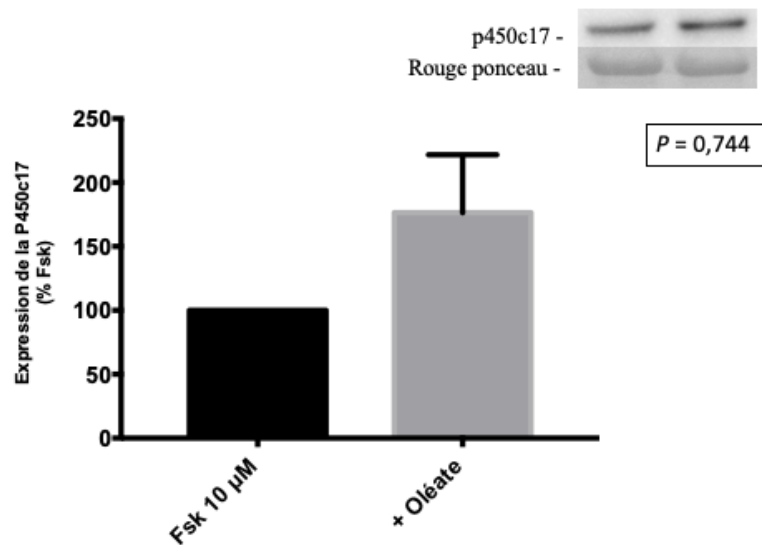


Figure 22 : Effet de 200 μ M d'oléate sur l'expression de la P450c17 chez des cellules NCI-H295R traitées à la Fsk

Les cellules ont été stimulées durant 48 h à 10 μ M de Fsk avec ou sans oléate. L'expression de la P450c17 a été corrigée par la quantité de protéines totales sur la membrane d'buvardage de type Western obtenu par Ponceau S. Les résultats de 16 expériences sont présentés en moyenne de % d'augmentation par rapport à la condition Fsk \pm SEM.

5.1.3 Effet de 200 μ M d'oléate sur la phosphorylation de ERK1/2

De plus, nous avons voulu évaluer l'impact d'une exposition à 200 μ M d'oléate sur la phosphorylation de ERK1/2 dans les cellules NCI-H295R en culture. À la figure 23, on remarque que p-ERK1/2 était significativement diminuée chez les cellules traitées à l'oléate et à la Fsk en comparaison avec la condition Fsk seule ($82,5\% \pm 23,8\%$ vs 100% . $P = 0,002$).

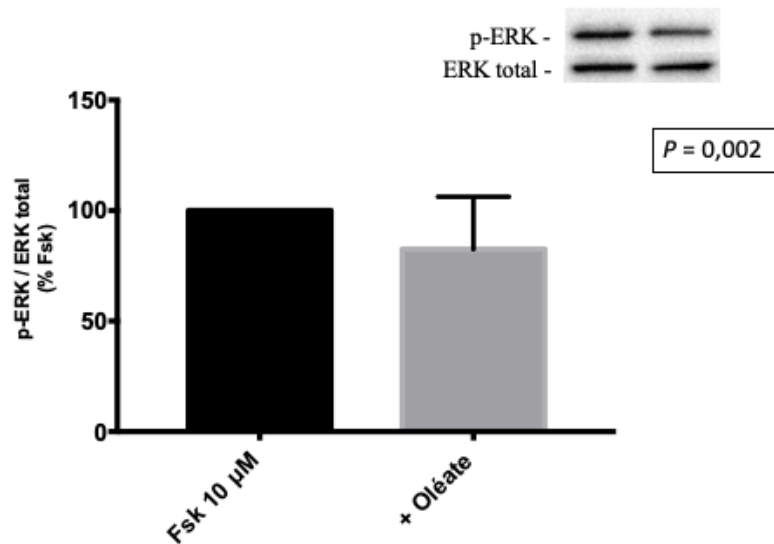


Figure 23 : Effet de 200 μ M d'oléate sur la phosphorylation de ERK1/2 chez des cellules NCI-H295R traitées à la Fsk

Les cellules ont été stimulées durant 48 h à 10 μ M de Fsk avec ou sans oléate. La phosphorylation de ERK1/2 a été corrigée par l'expression de ERK1/2 total obtenu par buvardage de type Western. Les résultats de 20 expériences sont présentés en moyenne de % d'augmentation par rapport à la condition Fsk \pm SEM.

5.1.4 Effet de 200 μ M d'oléate sur l'expression génique des enzymes impliquées dans l'androgénèse surrénalienne

Comme discuté dans une section précédente, du RT-PCR a été fait afin de déterminer si l'oléate avait un impact sur la transcription de gènes impliqués dans l'androgénèse dans une lignée immortalisée de cellules surrénaliennes humaines, les NCI-H295R. Dans nos 7 expériences, l'oléate ne semblait pas avoir d'effet sur la transcription du gène CYP17A1, qui code pour la protéine P450c17 ($99,9\% \pm 4,42\%$ vs 100% . $P = 0,813$), tandis que l'expression génique de HSD3B2, codant pour l'enzyme 3β -HSD, est diminuée de manière non significative chez les cellules exposées à l'oléate et à la Fsk ($86,7\% \pm 4,90\%$ vs 100% . $P = 0,078$).

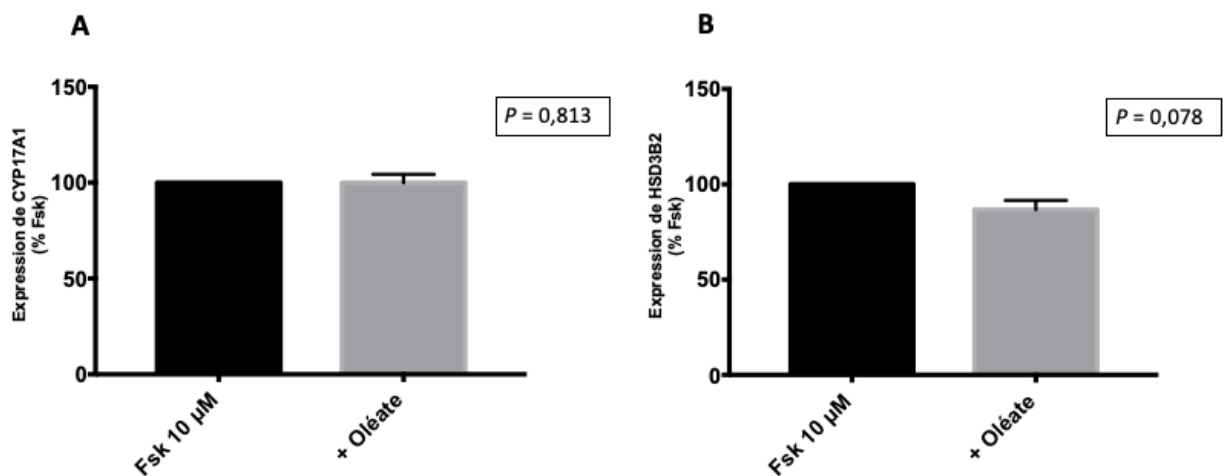


Figure 24 : Effet de 200 μ M d'oléate sur la transcription de CYP17A1 et de HSD3B2 chez des cellules NCI-H295R traitées à la Fsk

Les cellules ont été stimulées durant 48 h à 10 μ M de Fsk avec ou sans oléate. L'ARNm a été extrait et du RT-PCR a été fait afin d'évaluer l'expression génique des gènes A) CYP17A1 et B) HSD3B2. Les résultats de 7 expériences sont présentés en moyenne de % d'augmentation par rapport à la condition Fsk \pm SEM.

Dans un même ordre d'idée, les cellules traitées à 200 μ M d'oléate et à la Fsk démontraient une expression génique augmentée par rapport à la condition Fsk quant aux gènes suivants : CYB5A, codant pour le cofacteur cytochrome b5, ($128,2\% \pm 6,03\%$ vs 100% . $P = 0,016$) ainsi que CYPOR, qui code également pour un cofacteur de la P450c17, POR ($129,5\% \pm 4,68\%$ vs 100% . $P = 0,016$).

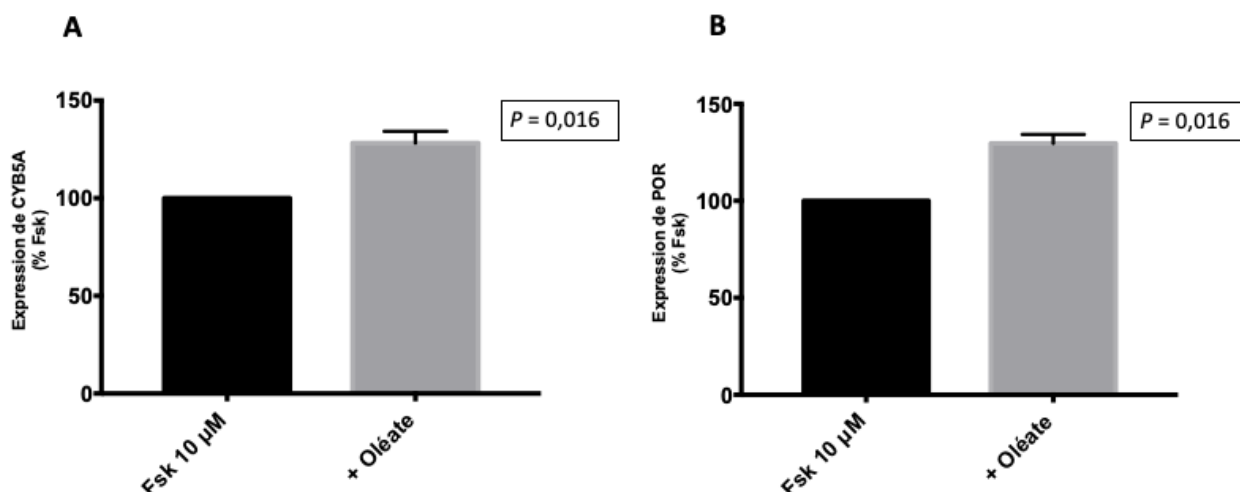


Figure 25 : Effet de 200 μ M d'oléate sur la transcription de CYB5A et de POR chez des cellules NCI-H295R traitées à la Fsk

Les cellules ont été stimulées durant 48 h à 10 μ M de Fsk avec ou sans oléate. L'ARNm a été extrait et du RT-PCR a été fait afin d'évaluer l'expression génique des cofacteurs de la P450c17 A) CYB5A et B) CYPOR. Les résultats de 7 expériences sont présentés en moyenne de % d'augmentation par rapport à la condition Fsk \pm SEM.

5.2 Cellules surrénaliennes humaines

Pour ce projet, un total de 14 glandes surrénales humaines ont pu être mises en culture suite à notre collaboration avec Transplant Québec. Parmi les donateurs d'organes, la moitié d'entre-eux étaient des femmes et l'âge moyen était de 46 ans. À noter que nous n'avons pas pu obtenir l'âge d'un des donateurs.

5.2.1 Effet de 200 μ M d'oléate sur la synthèse de DHEA

Comme expliqué dans la section 3.1.2, les cellules fasciculées et réticulées des glandes surrénales humaines ont été isolées puis exposées à la Fsk avec ou sans oléate durant 48 h. Le milieu de culture a été prélevé et la production de DHEA a été évaluée par dosage ELISA commercial. Le graphique 26 présente les résultats de dosage obtenu pour l'ensemble des glandes que nous avons mises en culture. Dans ce modèle, il semble que l'exposition à 200 μ M d'oléate n'augmente pas la production de DHEA des cellules exposées à la Fsk, en comparaison avec la condition Fsk ($105,4\% \pm 12,20\%$ vs 100% . $P = 0,952$).

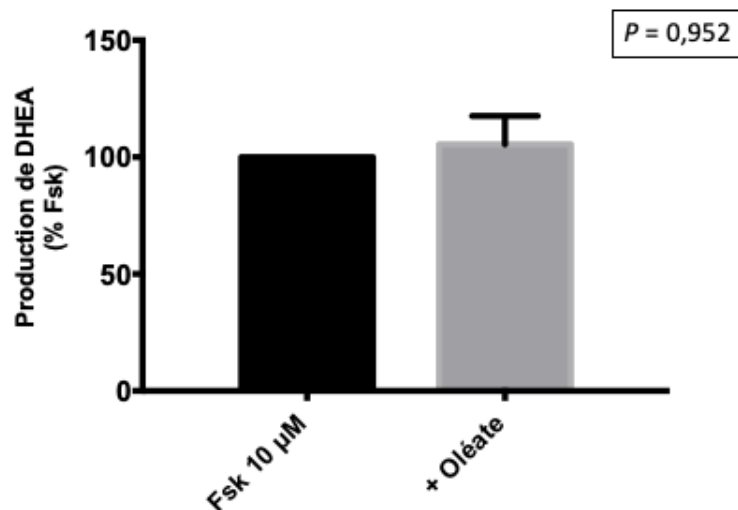


Figure 26 : Effet de 200 μ M d'oléate sur la production de DHEA chez des cellules surrénales humaines traitées à la Fsk

Les cellules surrénales issues d'une culture primaire ont été stimulées durant 48 h à 10 μ M de Fsk avec ou sans oléate. Le DHEA dans le milieu de culture a été dosé par ELISA et corrigé par la quantité de protéines. Les résultats de 14 glandes surrénales sont présentés en moyenne de % d'augmentation par rapport à la condition Fsk \pm SEM.

Comme il est connu que la production d'androgènes diminue avec l'âge (Baulieu *et al.* 2000) et plus particulièrement après 50 ans (Vermeulen 1983), nous nous sommes intéressés à savoir si la production de DHEA dans notre modèle de culture primaire allait différer entre les individus qui sont âgés de moins vs plus de 50 ans. Comme démontré à la figure 27A, les cellules surrénales provenant des donneurs de moins de 50 ans exposées à la Fsk et à l'oléate avaient une production de DHEA augmentée de manière non significative par

rapport à celles exposées à la Fsk seule ($141,6\% \pm 23,09\%$ vs 100% . $P = 0,063$). Ce résultat, bien que semblable à ce qui a été mesuré chez les NCI-H295R, est différent de ce qui a été obtenu chez les individus de plus de 50 ans, chez qui nous n'avons pas remarqué de différence significative quant à la synthèse de DHEA en comparaison avec la condition Fsk (figure 27B. $92,2\% \pm 7,122\%$ vs 100% . $P = 0,383$). En somme, ces résultats démontrent l'importance de considérer l'âge des individus lors des études portant sur l'androgénèse surrénalienne chez l'humain.

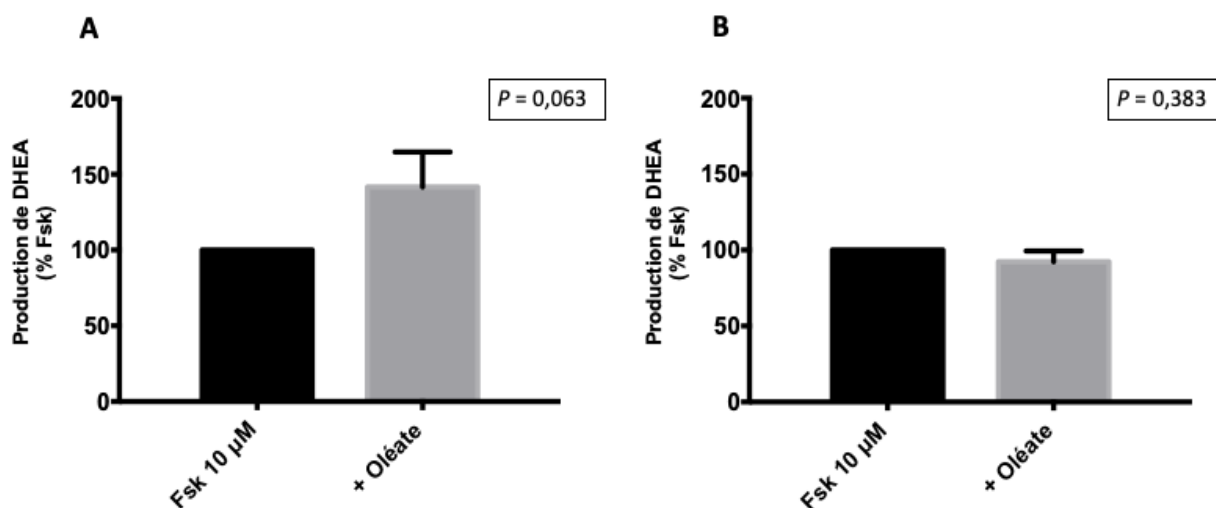


Figure 27 : Effet de 200 µM d'oléate sur la production de DHEA chez des cellules surrénaliennes humaines traitées à la Fsk et provenant de patients âgés de moins vs plus de 50 ans

Les cellules surrénaliennes issues d'une culture primaire ont été stimulées durant 48 h à 10 µM de Fsk avec ou sans oléate. Le DHEA dans le milieu de culture a été dosé par ELISA et corrigé par la quantité de protéines. Les résultats chez A) les individus de moins de 50 ans (n = 5) et B) les individus de plus de 50 ans (n = 8) sont présentés en moyenne de % d'augmentation par rapport à la condition Fsk ± SEM.

5.2.2 Effet de 200 µM d'oléate sur l'expression protéique de la P450c17

Tout comme nous avons fait avec les cellules NCI-H295R, nous avons évalué l'impact d'une exposition à 200 µM d'oléate sur l'expression de l'enzyme P450c17 dans notre modèle de cellules surrénaliennes humaines en culture primaire. Suite aux analyses d'ubiquitination de type Western, nous n'avons pas vu d'augmentation significative de l'expression protéique

de la P450c17 chez les cellules exposées à la Fsk et à l'oléate (figure 28. $105,7\% \pm 22,78\%$ vs 100% . $P = 0,677$). Par ailleurs, tel qu'exposé à la figure 29, nous n'avons pas pu montrer de différence après avoir séparé les individus selon leur âge, soit ceux ayant moins de 50 ans ($154,2\% \pm 46,94\%$ vs 100% . $P = 0,438$. $n = 5$) et ceux de plus de 50 ans ($86,11\% \pm 19,62\%$ vs 100% . $P = 0,688$. $n = 6$).

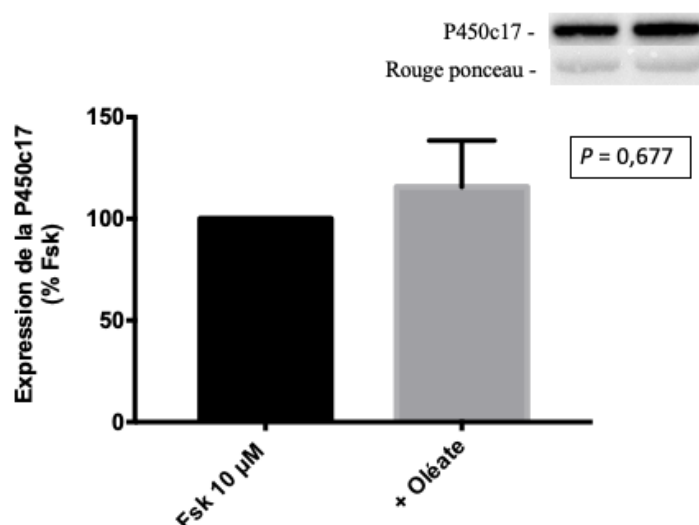


Figure 28 : Effet de 200 μ M d'oléate sur l'expression de la P450c17 chez des cellules surrénaliennes humaines traitées à la Fsk

Les cellules surrénaliennes issues d'une culture primaire ont été stimulées durant 48 h à 10 μ M de Fsk avec ou sans oléate. L'expression de la P450c17 a été corrigée par la quantité de protéines totales sur la membrane d'ubiquitination de type Western obtenu par Ponceau S. Les résultats de 12 glandes surrénales sont présentés en moyenne de % d'augmentation par rapport à la condition Fsk \pm SEM.

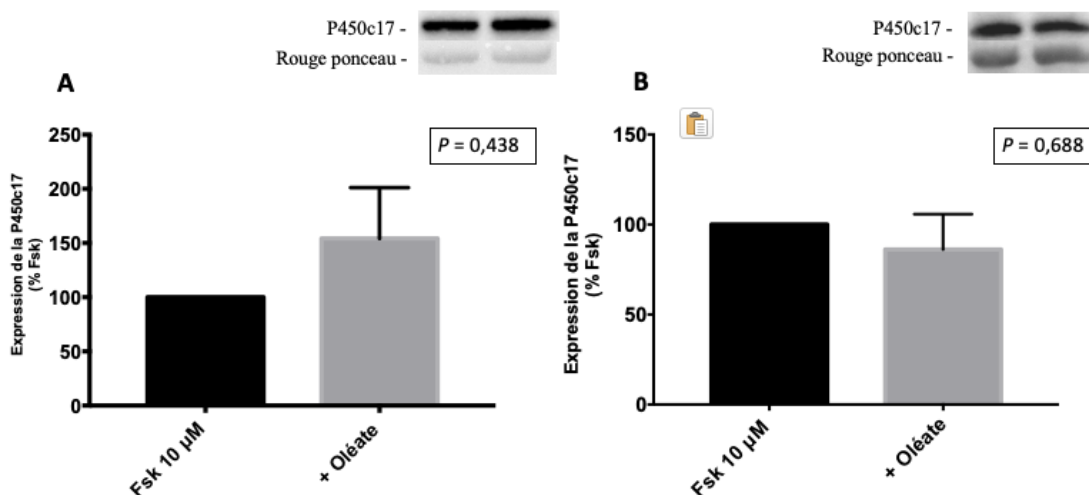


Figure 29 : Effet de 200 μ M d'oléate sur l'expression de la P450c17 chez des cellules surrénaliennes humaines traitées à la Fsk et provenant de patients âgés de moins vs plus de 50 ans

Les cellules surrénaliennes issues d'une culture primaire ont été stimulées durant 48 h à 10 μ M de Fsk avec ou sans oléate. L'expression de la P450c17 a été corrigée par la quantité de protéines totales sur la membrane d'ubiquitination de type Western obtenu par Ponceau S. . Les résultats chez A) les individus de moins de 50 ans (n = 5) et B) les individus de plus de 50 ans (n = 6) sont présentés en moyenne de % d'augmentation par rapport à la condition Fsk \pm SEM.

5.2.3 Effet de 200 μ M d'oléate sur la phosphorylation de ERK1/2

La phosphorylation de ERK1/2 suite à une exposition de 48 h à de l'oléate a aussi été évaluée dans notre modèle de cellules fasciculées réticulées provenant de cultures primaires. Dans celles-ci, le traitement à la Fsk et à 200 μ M d'oléate n'a pas changé la phosphorylation de ERK1/2 en comparaison avec les cellules traitées seulement à la Fsk (figure 30. $136,7\% \pm 37,77\%$ vs 100% . $P = 0,922$). Finalement, nous avons obtenu des résultats similaires après la séparation des donneurs d'organes selon leur âge, soit ceux les moins de 50 ans ($116,1\% \pm 46,42\%$ vs 100% . $P = 0,625$. n = 5) et ceux âgés de plus de 50 ans ($157,3\% \pm 63,66\%$ vs 100% . $P = 0,438$. n = 5).

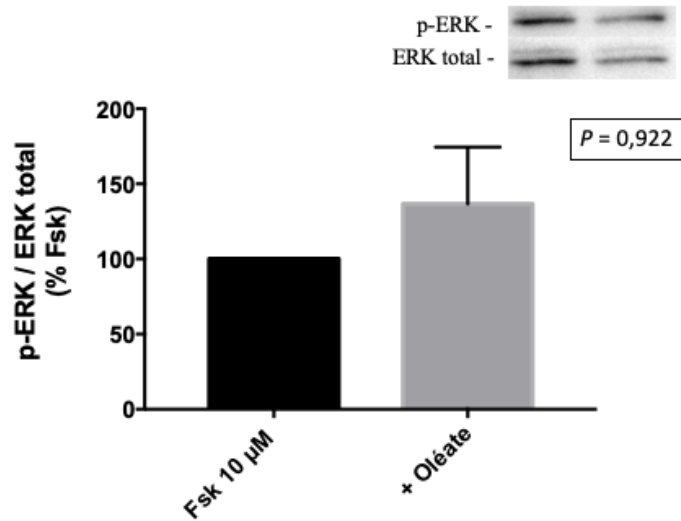


Figure 30 : Effet de 200 μ M d'oléate sur la phosphorylation de ERK1/2 chez des cellules surrénaliennes humaines traitées à la Fsk

Les cellules surrénaliennes issues d'une culture primaire ont été stimulées durant 48 h à 10 μ M de Fsk avec ou sans oléate. La phosphorylation de ERK1/2 a été corrigée par l'expression de ERK1/2 total obtenu par buvardage de type Western. Les résultats de 10 glandes surrénales sont présentés en moyenne de % d'augmentation par rapport à la condition Fsk \pm SEM.

DISCUSSION (PROJET 1)

Les objectifs de cette première partie de mon projet de maîtrise étaient de comparer chez les femmes en processus de FIV ayant des niveaux élevés ($\geq 50^{\text{e}}$ percentile) vs bas ($< 50^{\text{e}}$ percentile) de lipides dans leur liquide folliculaire différents paramètres comme les mesures anthropométriques, les issues de fertilité, la production hormonale ainsi que l'expression des PKC et des médiateurs de la signalisation de l'insuline dans les cellules de la granulosa. Un second objectif du projet visait à corrélérer les variables décrites précédemment entre-elles.

Les analyses effectuées nous ont permis de démontrer que dans la population étudiée dans le cadre de ce projet, il n'y avait pas de différences significatives quant aux mesures anthropométriques, aux caractéristiques cliniques et aux issues de fertilité chez nos 2 groupes de participantes. Par contre, il est intéressant de noter que les femmes ayant des niveaux élevés d'AGNE+TG dans leur liquide folliculaire étaient plus âgées et avaient également un tour de taille supérieur en comparaison avec celles ayant des niveaux inférieurs de lipides intra-ovariens. De plus, nous avons constaté qu'il semble que des hauts niveaux de lipides dans l'environnement intra-ovarien influencent la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa et des cellules thécales. En fait, une augmentation de la production de testostérone totale, d'estradiol et du ratio estradiol/progestérone a été constatée dans le liquide folliculaire de ces femmes. Nous avons également pu démontrer des corrélations significatives entre la concentration de lipides dans le liquide folliculaire et le ratio estradiol/progestérone ainsi qu'avec la testostérone dosée dans le milieu ovarien. Par ailleurs, entre autres à cause du petit nombre d'échantillons analysés, notre étude n'a pas permis de démontrer un impact de la lipotoxicité intra-ovarienne sur l'expression des PKC, même si PKC α avait une tendance à être davantage exprimée au niveau de la membrane, ainsi que des protéines p-p38, p-JNK et p-Akt dans les cellules de la granulosa humaines. Finalement, il n'y avait pas d'association statistiquement significative entre ces variables et les niveaux de lipides présents dans le liquide folliculaire des femmes recrutées.

6.1 Comparaison des paramètres cliniques selon le niveau de lipides du liquide folliculaire

Tel que mentionné précédemment, les participantes de notre étude ayant de bas niveaux d'AGNE+TG dans leur liquide folliculaire avaient des paramètres cliniques non significativement différents de celles ayant des niveaux plus élevés de lipides, mais certaines tendances préalablement décrites ont été observées. Ceci est en accord avec les résultats d'une étude préalablement publiée dans laquelle les auteurs ont comparé différents paramètres chez des femmes ayant des taux d'AGNE dans leur liquide folliculaire inférieurs vs supérieurs à 0,232 $\mu\text{mol/mL}$ (0,232 mmol/L) (Jungheim *et al.* 2011). À noter que les auteurs de cette étude n'ont pas dosé les TG présents dans le liquide folliculaire, ce qui explique que nous avons obtenu des niveaux de lipides (AGNE +TG) supérieurs dans notre étude, la médiane étant de 0,271 mmol/L .

Par ailleurs, au tableau 9, nous pouvons remarquer que le tour de taille semble être différent entre les groupes ($P = 0,07$), contrairement à l'IMC ($P = 0,24$). Dans un même ordre d'idée, nos résultats au tableau 9 démontrent également que le tour de taille est davantage corrélé au niveau de lipides dans le liquide folliculaire ($P = 0,05$) que l'est l'IMC ($P = 0,43$). Ceci est différent de ce qui a été obtenu par une autre étude publiée par notre laboratoire, qui démontrait que l'IMC et les niveaux de lipides du liquide folliculaire de femmes en processus de FIV étaient significativement corrélés (Gervais *et al.* 2015). Par contre, il est important de souligner que le nombre de patientes recrutées pour cette étude était plus grand et qu'elles avaient un IMC ainsi qu'un tour de taille médian supérieurs à celles présentées dans ce mémoire, ce qui pourrait expliquer la différence entre les résultats obtenus. Par ailleurs, tel que démontré dans la littérature, l'association entre le tour de taille et l'IMC avec les lipides du liquide folliculaire semblent être expliquée par les niveaux de TG plutôt que ceux des AGNE (Pantasri *et al.* 2015). En fait, comme les AGNE sont rapidement captés par les cellules intra-ovariennes, contrairement aux TG qui voyagent à l'aide de transporteurs, il est logique de penser que l'association entre les mesures d'adiposité (IMC et tour de taille) et les AGNE soit inférieure à celle obtenue avec les TG.

6.2 Impact des lipides de l'environnement intra-ovarien sur les issues de fertilité

Les données récoltées dans ce projet ne démontrent pas d'impact des lipides du liquide folliculaire sur les issues de fertilité suivantes : nombre d'ovules récoltés, % d'ovules au stade MII, % d'ovules fécondés ainsi que % d'embryons au jour 3. Par contre, au tableau 10, il est possible de noter que les patientes qui avaient plus de lipides dans leur liquide folliculaire avaient également un % de succès de la FIV inférieur au second groupe. Nos données sur le % d'ovules au stade MII semblent en désaccord avec ce qui a été publié dans l'article de Jungheim *et al* dont il a été question précédemment, puisqu'il y était démontré que les femmes avec des niveaux d'AGNE intra-ovariens supérieurs à 0,232 $\mu\text{mol/mL}$ avaient plus de follicules de mauvaise qualité que celles ayant moins d'AGNE (Jungheim *et al.* 2011). Dans cette étude, l'indice de qualité des ovocytes a été mesuré différemment de la nôtre, c'est-à-dire par la présence de moins de 60 % de complexes cumulus-ovocytes de grade 3 ou 4. Le grade 3 correspond à la présence au microscope d'un complexe cumulus-ovocyte dispersé et étendu, tandis que le grade 4 représente un complexe mature avec ovocyte visible et avec un cumulus étendu (Jungheim *et al.* 2011). En fait, nous avons plutôt choisi d'utiliser le stade de MII afin d'évaluer les ovocytes ponctionnés, puisque cette donnée permet d'évaluer directement le stade de maturité de l'ovocyte. Il a déjà été démontré que chez des femmes en processus de FIV, le grade morphologique des ovocytes n'était pas représentatif de la maturité cellulaire et n'était pas corrélé avec le % de fécondation de l'ovocyte (Rattanachaiyanont *et al.* 1999). Dans ce sens, nous sommes d'avis que l'utilisation du stade MII était un marqueur adéquat de la maturité des ovocytes. À noter que les autres marqueurs des issues de fertilité préalablement énumérés sont comparables avec les données déjà présentées dans l'étude de Jungheim *et al*, ou aucune différence significative, outre la qualité des ovocytes, n'avait été constatée.

Les analyses de corrélations entre les issues de fertilité et les niveaux d'AGNE + TG dans le liquide folliculaire sont présentées au tableau 11. Aucune corrélation statistiquement significative entre ces variables n'a pu être établie dans notre cohorte de participantes. Ces résultats viennent appuyer ceux publiés dans un article de notre laboratoire, qui n'avait pu établir une corrélation entre les lipides du liquide folliculaire et les issues de fertilité, même

après avoir corrigé pour l'âge des participantes (Gervais *et al.* 2015). D'un autre côté, une étude réalisée chez des femmes SOPK en processus de FIV a démontré une corrélation positive significative entre le taux de fragmentation des embryons au jour 3 et les niveaux d'oléate du liquide folliculaire (Niu *et al.* 2014). Ils ont également trouvé une association négative chez les femmes SOPK obèses entre les niveaux de stéarate du liquide folliculaire et le score du blastomère. Dans ce sens, il semble que les impacts des lipides, et plus particulièrement des AGNE, sur les issues de fertilité dépend du type d'acide gras que l'on retrouve dans le liquide folliculaire. Comme les femmes recrutées pour le projet décrit dans ce mémoire n'étaient pas obèses, il est possible que les AGNE retrouvés dans leur liquide folliculaire soient différents de ce qui a été mesurés chez les femmes obèses dans l'étude de Niu *et al.*, ce qui expliquerait l'absence d'impact des lipides sur les issues de fertilité dans notre projet, contrairement à cette étude. Cette distinction quant au niveau d'obésité entre les autres études et la nôtre est importante à souligner, puisque dans notre cohorte de femmes non obèses, seules celles ayant un tour de taille élevé étaient susceptibles de présenter une dysfonction du tissu adipeux, une lipotoxicité ainsi qu'une résistance à l'insuline, le tout pouvant ultimement mener à une diminution de la fertilité.

6.3 Rôle des lipides sur la stéroïdogénèse

6.3.1 Impact sur la production de testostérone

Comme démontré à la figure 3A, les femmes qui ont plus d'AGNE + TG dans leur liquide folliculaire ont également des niveaux de testostérone augmentés dans leur environnement intra-ovarien, bien que ce résultat soit non significatif. Par ailleurs, nos résultats démontrent que les lipides du liquide folliculaire sont significativement associés à la testostérone qu'on y retrouve ($r = 0,49$. $P = 0,01$), ce qui correspond avec ce qui a été publié précédemment dans la littérature (Gervais *et al.* 2015). Tel que démontré dans cet article, cette corrélation serait médiée par la production de métabolites lipidiques comme les acylcarnitines, qui sont fortement corrélés avec les niveaux de testostérone du liquide folliculaire. Toujours dans cette étude de notre laboratoire, comme les niveaux d'acylcarnitines C16/C3 étaient

positivement associés avec les lipides du liquide folliculaire, on peut penser que la production de ces métabolites serait causée par un surplus d'AGNE dans le milieu intra-ovarien. Comme dans mon projet nous avons obtenu une corrélation semblable entre la testostérone du milieu intra-ovarien ainsi que les lipides, et que notre taille d'échantillon était bien plus petite, nous n'avons pas jugé pertinent de doser à nouveau les acylcarnitines dans notre cohorte actuelle.

Une des forces du projet traité dans ce mémoire est que nous avons accès aux échantillons sanguins des patientes afin de comparer les dosages hormonaux du liquide folliculaire et du sang. À la figure 6, on remarque qu'il n'y a pas de différence entre les femmes ayant peu vs beaucoup de lipides dans leur liquide folliculaire quant aux niveaux de testostérone sanguins. Ces données préliminaires peuvent nous amener à penser que le dosage de testostérone sanguin n'est pas un bon marqueur de l'impact de la lipotoxicité intra-ovarienne sur la production d'androgènes, bien que le prélèvement soit beaucoup moins invasif que celui du liquide folliculaire. Une étude chez des femmes en FIV avait également démontré une absence de corrélation entre les niveaux de testostérone du liquide folliculaire et ceux retrouvés dans le sang (von Wolff *et al.* 2017). Par contre, les patientes de cette cohorte, contrairement à la nôtre, n'avaient pas eu de stimulation hormonale durant leur FIV. Cette différence est importante, puisque la production de testostérone pourrait potentiellement être influencée par les analogues de LH et FSH injectés dans le cadre d'une FIV avec stimulation. Dans ce sens, il serait possible de dire qu'il serait préférable d'effectuer les dosages sanguins et de liquide folliculaire chez des femmes ayant des cycles de FIV naturels (sans stimulation par la LH et FSH), mais puisque ce protocole ne permet pas de récolter plusieurs follicules, ce dernier est rarement fait en clinique.

6.3.2 Impact sur la synthèse d'estradiol et de progestérone

Contrairement à l'hypothèse formulée au début du projet, nous avons été surpris de constater que dans notre cohorte, le ratio estradiol/progestérone du liquide folliculaire était significativement augmenté chez les femmes avec des niveaux élevés de lipides dans leur liquide folliculaire (figure 5A. $P = 0,009$). L'augmentation de ce ratio est expliquée par la

production accrue d'estradiol chez les patients avec plus de lipides, tandis que les niveaux de progestérone sont similaires entre les groupes (figure 4B. $P = 0,30$). Aussi, une analyse de corrélation nous a permis de démontrer une association significative entre le ratio estradiol/progestérone et les AGNE + TG du milieu intra-ovarien (figure 5B, $r = 0,57$. $P = 0,002$). Comme il a été démontré dans la littérature, un niveau d'estradiol et un ratio estradiol/progestérone augmentés sont associés à de meilleures issues de fertilité chez des femmes en processus de FIV (Eyvaznejad *et al.* 2018). De plus, une étude a fait état d'une diminution de l'expression de la protéine aromatasé dans des cellules de la granulosa humaines chez des femmes obèses (Xu *et al.* 2019). Dans ce sens, nous avons émis l'hypothèse que la lipotoxicité induite par les lipides intra-ovariens pourrait causer une diminution de l'estradiol et du ratio estradiol/progestérone du liquide folliculaire et ainsi affecter les chances de succès de la procédure de FIV. Nous pensons que quelques éléments pourraient expliquer pourquoi nous n'avons pas eu ces résultats dans notre cohorte. Il est possible que l'augmentation des niveaux d'estradiol chez les femmes avec beaucoup de lipides dans leur liquide folliculaire soit expliqué par l'importante production de testostérone chez ces femmes, ce qui augmenterait l'estradiol par l'action de l'aromatasé. Il se peut aussi que dans cette population moins obèse que celles d'autres études déjà publiées, l'activité de cette enzyme dans les cellules de la granulosa soit augmentée suite à la stimulation de la FIV. Il faut savoir que les données de la littérature sont assez contradictoires en ce qui a trait au lien entre les lipides du liquide folliculaire et la production d'estradiol. En fait, dans un modèle bovin *in vivo* visant à étudier l'impact d'une diète restreinte en calories sur le profil hormonal, les vaches avaient des niveaux d'estradiol et de ratio estradiol/progestérone intra-ovariens diminués, tandis que la concentration en AGNE du liquide folliculaire étaient eux augmentés significativement (Comin *et al.* 2002). Bien que les auteurs ne discutent pas du lien entre ces observations, on peut se demander si les lipides intra-ovariens ont un impact sur la diminution de production d'estradiol par les cellules de la granulosa. À l'inverse, une étude *in vitro* effectuée chez des cellules de la granulosa bovines a démontré que les cellules traitées avec une combinaison d'AGNE produisaient plus d'estradiol que celles non traitées (Vanholder *et al.* 2005). En somme, d'autres études, préférablement chez l'humain, sont nécessaires afin d'éclaircir l'impact des lipides sur la production d'estradiol par les cellules de la granulosa.

6.4 Impact des lipides du liquide folliculaire sur l'expression et la localisation des PKC des cellules de la granulosa

Afin d'évaluer et de comparer l'activation des PKC dans les cellules de la granulosa des 2 groupes de patientes, les compartiments cytoplasmiques et membranaires ont été isolés puis analysés par la méthode d'ubiquitination de type Western. Comme les PKC activées se retrouvent au niveau de la membrane, la séparation des protéines cytosoliques et membranaires était une manière adéquate d'évaluer leur activation. À notre connaissance, aucune étude dans un modèle humain de cellules de la granulosa n'a investigué les différents types d'isoformes des PKC qu'on y retrouve. Afin de cibler ces dernières pour notre projet, nous nous sommes basés sur un article publié en 2014, dans lequel les auteurs avaient découvert la présence des isoformes α , ϵ et δ dans les cellules de la granulosa de souris (Tepekoy *et al.* 2014).

Tel que démontré à la figure 11, nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence une différence significative quant à l'activation des PKC entre les femmes ayant peu vs beaucoup de lipides dans leur liquide folliculaire. Par contre, PKC α semble davantage exprimée au niveau de la membrane chez les femmes ayant beaucoup d'AGNE+TG dans leur environnement intra-ovarien, mais le manque de puissance explique la non-significativité de ces données. Plusieurs facteurs ont pu contribuer à l'obtention de ce résultat. Tout d'abord, même si le protocole de séparation des fractions cytosoliques et membranaires avait été mis au point dans les cellules KGN avant de débiter les expériences sur les cellules humaines, il a malheureusement fallu recommencer les tests dans le modèle humain. De ce fait, plusieurs échantillons ont donc servi à mettre au point la méthode de séparation des fractions. Par ailleurs, comme le protocole demandait l'utilisation d'un grand nombre de cellules, il n'a pas été possible de le réaliser chez les patientes ayant eu peu d'ovules ponctionnés lors de leur prélèvement. Aussi, il y avait beaucoup de variabilité dans les résultats obtenus, ce qui rend difficile l'obtention de données concluantes quant aux ubiquitinations de type Western qui ont été faites pour ce projet. Il aurait été également possible d'évaluer l'activation des PKC en faisant des ubiquitinations des différents isoformes des PKC phosphorylées. Or, comme

mentionné à la section 1.6, cette méthode n'est pas à privilégier pour étudier la forme active des PKC, puisque ces protéines peuvent être phosphorylées et se retrouver au cytosol, c'est-à-dire dans un état inactif.

Comme l'impact des lipides du milieu intra-ovarien sur l'activation des PKC des cellules ovariennes humaines n'est pas défini dans la littérature actuelle, nous avons émis l'hypothèse qu'un surplus de lipides et leurs métabolites dans le liquide folliculaire peut contribuer à activer les PKC des cellules adjacentes à ce milieu, ce qui pourra par la suite entraîner des modifications au niveau de la signalisation de l'insuline. En effet, plusieurs études réalisées dans d'autres modèles nous amènent à penser que ce pourrait être le cas. Entre autre, une expérience a démontré que dans des muscles de rats qui avaient eu une infusion de 5h de lipides/héparine, l'expression de PKC θ à la membrane était 3 fois supérieure à celle des rats non traités (Griffin *et al.* 1999). De plus, le groupe expérimental avait une diminution de la phosphorylation en tyrosine de la protéine IRS1 et de l'expression de PI3K dans leurs cellules musculaires. Des résultats similaires ont également été obtenus dans une cohorte d'hommes ayant reçu une infusion de lipides/héparine associée à une clamp euglycémique hyperinsulinémique durant 6h. Une biopsie musculaire a permis de démontrer que la fraction des PKC β et δ présente à la membrane était supérieure à celle obtenue au temps 0, soit avant le début de l'infusion (Itani *et al.* 2002).

6.5 Impact des lipides du liquide folliculaire sur l'expression des protéines impliquées dans la signalisation de l'insuline des cellules de la granulosa

Suite aux buvardages de type Western, nous n'avons pas pu détecter de différence significative entre nos groupes quant à l'expression des protéines suivantes : p-p38, p-JNK et p-Akt. Le petit nombre d'échantillons ainsi que la grande variabilité des résultats obtenus peuvent contribuer à cette absence de différence. En fait, nous nous attendions à observer une augmentation de la phosphorylation de p38 chez les femmes avec des hauts niveaux de lipides dans leur liquide folliculaire, puisque cette observation a été décrite dans d'autres modèles. Une étude a démontré que des hépatocytes de souris traités durant 16h avec 0,5

mM d'oléate avaient une augmentation de p-p38 par rapport aux cellules non traitées (Liu *et al.* 2007). Par ailleurs, la phosphorylation en tyrosine de IRS1 était diminuée tandis que la phosphorylation en sérine de cette même protéine était légèrement augmentée dans les cellules traitées aux AGNE vs les cellules contrôles. Si nous transposons ces résultats dans notre modèle de cellules de la granulosa exposées à une haute concentration de lipides, nous pouvons penser que l'augmentation de la phosphorylation de p38 serait associée à une augmentation de la phosphorylation en sérine de IRS1, diminuant du même coup la signalisation de l'insuline dans les cellules ovariennes.

Concernant une des voies impliquées dans la signalisation de l'insuline, une étude intéressante s'est penchée sur l'impact de l'inhibition de la protéine PI3K sur la stéroïdogénèse de complexes cumulus-ovocytes bovins *in vitro*. On peut y voir que l'ajout d'un inhibiteur de PI3K (100 μ M de LY294002) dans le milieu de culture durant 24h a significativement diminué la production d'estradiol et le ratio estradiol/progestérone des complexes traités ou non à la FSH (De Souza *et al.* 2018). Comme ce ratio hormonal peut être considéré comme un reflet de la bonne fonction des cellules de la granulosa en traduisant la conversion des androgènes en estrogènes, nous pouvons donc penser qu'une dysfonction de la voie PI3K/Akt pourrait être associée à des moins bonnes issues de fertilité. Par contre, cette hypothèse ne concorde pas avec les résultats présentés dans un article publié dans la revue *Human Reproduction* en 2017. En effet, les auteurs ont démontré que les cellules de la granulosa des femmes ayant eu une grossesse après une FIV avaient des niveaux diminués de transcrits de 11 gènes impliqués dans la voie PI3K/Akt en comparaison avec des femmes dont la FIV n'avait pas fonctionné (Artini *et al.* 2017). Comme cette expérimentation a été faite en incluant seulement 16 patientes, d'autres études de ce type sont nécessaires afin de mieux comprendre l'implication des modifications des gènes de la voie PI3K/Akt sur les issues de fertilité. Par ailleurs, une autre équipe s'est questionnée sur l'activation de la voie d'Akt dans des cellules de la granulosa de femmes en surpoids ou obèses et en processus de FIV. Leurs résultats montrent une diminution de p-Akt et une augmentation de p-GSK3 β , une protéine normalement inhibée par Akt, en comparaison avec des cellules de femmes avec un IMC entre 18,5-23,9 kg/m² (Xu *et al.* 2019). Par contre, comme les cellules de la granulosa ont été mises en culture au moins 24h suite à la ponction d'ovules, il est possible que l'effet

de l'environnement intra-ovarien potentiellement lipotoxique des femmes en surpoids ou obèses soit moins présent lors des analyses d'ubiquitination de type Western. Dans ce sens, il aurait été bien de comparer ce résultat avec des cellules de la granulosa de ces mêmes patientes, mais n'ayant pas été mises en culture. Il aurait aussi été possible de comparer les données avec des cellules de la granulosa en culture suite à 24h d'exposition à des AGNE.

6.6 Forces et limites de l'étude actuelle

Le projet décrit dans ce mémoire se veut la suite d'une étude publiée par un des anciens membres du laboratoire (Gervais *et al.* 2015). Contrairement à celle-ci, des échantillons sanguins ont été prélevés chez les participantes, ce qui nous a permis de corréler les dosages de liquide folliculaire avec ces derniers quant au niveau de testostérone, d'estradiol, de progestérone et de lipides (AGNE + TG). Par ailleurs, nous avons également pu récupérer les cellules de la granulosa des participantes suite à leur ponction d'ovules. Comme nous n'avons pas mis les cellules en culture, nous pensons que l'effet de l'environnement intra-ovarien sur l'expression des protéines aurait pu être reflétée dans les analyses protéiques, contrairement à si elles avaient été mises en culture. Aussi, un protocole de purification au Percoll a été fait afin de séparer les cellules de la granulosa des globules rouges présents dans l'échantillon, ce qui a pu éviter de causer des biais dans nos analyses. De plus, le devis de ce projet était approprié afin de comparer et corréler les dosages hormonaux et de lipides du liquide folliculaire avec de nombreux paramètres, tels les caractéristiques cliniques, les dosages d'échantillons sanguins, les analyses protéiques ainsi que les issues de fertilité. La survenue de la pandémie à la COVID-19 a aussi rendu impossible la poursuite du recrutement dans les mois précédant la rédaction de ce mémoire.

Une des limites de cette étude est définitivement le nombre de participantes recrutées. Au début du projet, nous avons établi qu'il serait nécessaire d'inclure 60 patientes pour obtenir une puissance de 80%. Par contre, au moment du recrutement, les frais liés à la procédure de FIV n'étaient plus remboursés par la Régie de l'assurance maladie du Québec (RAMQ), de sorte que peu de procédures de procréation assistée étaient réalisées dans la province. Les coûts élevés expliquent donc la difficulté de recruter des patientes en processus de FIV.

Aussi, comme le prélèvement de liquide folliculaire est invasif et doit se faire par un gynécologue-obstétricien, il n'aurait pas été envisageable de le faire dans un contexte de recherche seulement. Une seconde lacune du projet est le nombre d'échantillons qui ont pu être analysés par des buvardages de type Western. Comme de nombreux tests ont été nécessaires afin de mettre au point la méthode, nous n'avons pas eu assez de matériel pour faire les analyses chez toutes les participantes. Une autre limite de ce projet qui a pu affecter nos résultats est le délai entre la ponction d'ovules et le traitement des échantillons. En fait, comme on avait accès au liquide folliculaire seulement à la fin de la ponction et que celle-ci pouvait durer jusqu'à 30 minutes, il est possible que des changements au niveau de la phosphorylation de certaines protéines aient pu se produire. Finalement, le choix de la méthode de dosage de la testostérone, de l'estradiol et de la progestérone pourrait être un point faible du projet. Étant donné le nombre d'échantillons et les coûts associés, nous avons choisi de les doser par ELISA et non pas par LC-MS/MS. Ceci rend donc plus ardue la comparaison entre nos résultats de dosage et ceux publiés dans la littérature, puisque plusieurs équipes utilisent le LC-MS/MS.

DISCUSSION (PROJET 2)

Afin d'atteindre les objectifs de ce projet, l'impact de 200 μ M d'oléate sur la production de DHEA a été évaluée chez la lignée cellulaire NCI-H295R. Les cellules exposées à l'oléate et à la Fsk avaient une surproduction de DHEA en comparaison avec la condition Fsk. Bien que non significatif, un résultat semblable a été obtenu chez les cellules surrénaliennes humaines provenant d'individus de moins de 50 ans, tandis qu'il n'y avait pas de différence chez ceux plus âgés. Par ailleurs, l'expression protéique de la P450c17 ainsi que l'expression génique de CYP17A1 n'étaient pas significativement augmentées dans les cellules exposées aux AGNE dans ces 2 modèles. De manière intéressante, nous avons pu démontrer que l'expression des gènes CYB5A et CYPOR, tous deux cofacteurs de la P450c17, était supérieure chez les cellules NCI-H295R traitées à l'oléate et à la Fsk. Finalement, les buvardages de type Western de la protéine ERK1/2 phosphorylée et totale nous ont permis d'évaluer l'impact de 200 μ M d'oléate sur cette dernière. Chez les NCI-H295R, les cellules en présence d'AGNE et de Fsk avaient une diminution de la protéine ERK1/2 activée par rapport à celles traitées à la Fsk. Comme il en sera question dans la section 7.3 ci-dessous, ce résultat n'a pu être reproduit dans le modèle de cellules surrénaliennes humaines, même après avoir séparé les donneurs selon leur âge.

7.1 Effet de l'oléate sur la production de DHEA

Comme résumé plus tôt, les résultats issus de nos 2 modèles d'étude ont démontré que la synthèse de DHEA était augmentée chez les cellules exposées à l'oléate durant une période de 48 h. Les données présentées dans ce projet sont en accord avec celles publiées dans un article de notre laboratoire, dans lequel il a été démontré que les cellules surrénaliennes bovines en culture primaire avaient une production de DHEA augmentée suite à un traitement de 48 h à la Fsk et à 100 μ M de palmitate, qui est un AGNE provoquant plus d'apoptose que l'oléate (Bellanger *et al.* 2012).

Dans un même ordre d'idée, une étude visant à évaluer l'impact *in vivo* des AGNE sur la production d'androgènes surrénaliens a été faite dans une cohorte exclusivement composée d'hommes, afin d'éviter un biais potentiel causé par la production ovarienne d'androgènes. Les auteurs ont démontré que les individus exposés à une infusion de lipides/héparine durant 6 h avaient une production augmentée de DHEA en comparaison avec ceux recevant une infusion de solution saline/héparine 0,9% (Mai *et al.* 2006). Par ailleurs, ce devis d'expérience a été repris par le même groupe de chercheurs pour étudier à nouveau l'impact des AGNE sur l'androgénèse, mais dans une cohorte de 12 femmes non ménopausées. Les participantes recevant une infusion de lipides/héparine avaient également une production de DHEA augmentée par rapport à aux femmes revenant l'infusion de saline/héparine (Mai *et al.* 2008). De ce fait, nous pouvons conclure que dans notre modèle de cellules surrénaliennes en culture primaire, le sexe des individus n'est pas un facteur confondant, puisque des résultats *in vivo* similaires ont été obtenus dans les études présentées dans cette section.

De plus, une des forces de notre étude était la comparaison de l'androgénèse entre nos 2 modèles cellulaires. En fait, nous avons constaté que l'augmentation de la production de DHEA chez les cellules NCI-H295R et les cellules surrénaliennes des donneurs de moins de 50 ans exposées à 200 μ M d'oléate était assez similaire dans notre étude ($149,1\% \pm 10,32\%$ vs $141,6\% \pm 23,09\%$). Cette observation nous confirme que la lignée cellulaire est un modèle approprié pour l'étude de la stéroïdogénèse surrénalienne, ce qui est rassurant puisque l'accès aux glandes surrénales humaines pour les projets de recherche est assez limitée. Finalement, nous n'avons pas été étonné d'observer l'absence d'effet de l'oléate chez les cellules surrénaliennes des donneurs âgés de plus de 50 ans. Comme mentionné lors de la présentation des résultats, il est connu que la production d'androgènes diminue avec l'âge. Dans ce sens, il est plausible que l'augmentation du DHEA induite par les AGNE et la lipotoxicité ne puisse être reproduite dans ce modèle d'individus plus âgés, puisque les cellules sont moins en mesure de synthétiser des androgènes.

7.2 Effet de l'oléate sur l'expression de la P450c17, de ses cofacteurs cytochrome b5 et POR ainsi que sur la 3 β -HSD

Pour mieux comprendre par quels mécanismes l'oléate cause une augmentation de la synthèse de DHEA dans nos cellules surrénaliennes immortalisées et de culture primaire, nous avons évalué par buvardage de type Western l'expression protéique de la P450c17 ainsi que l'expression de son gène CYP17A1 par RT-PCR chez les NCI-H295R. Dans ces cellules, l'expression protéique de la P450c17 était augmentée de manière non significative chez les cellules exposées à l'oléate et à la Fsk. Par contre, dans le modèle de cellules surrénaliennes en culture primaire, nous n'avons pas vu de différence quant à l'expression de cette enzyme, même après avoir séparé les donneurs selon leur âge. De plus, le gène CYP17A1 était exprimé de manière semblable entre les cellules traitées à l'oléate et à la Fsk *vs* celles exposées à la Fsk seulement.

Les données obtenues chez les NCI-H295R reflètent les résultats publiés dans un modèle de cellules surrénaliennes bovines en culture, dans lequel un traitement au palmitate et à la Fsk causait une augmentation non significative ($148,3\% \pm 22$. $P = 0,08$) de l'expression protéique de la P450c17 (Bellanger *et al.* 2012). Des changements au niveau de cette enzyme clé de la stéroïdogénèse et de ses cofacteurs pourraient donc expliquer la surproduction d'androgènes qui caractérise souvent les femmes SOPK. Quelques auteurs se sont penchés sur l'étude des mécanismes impliqués dans l'hyperandrogénisme et des observations intéressantes ont pu être faites à ce sujet. En réalisant des analyses de RT-PCR dans des cellules thécales provenant de femmes SOPK, des chercheurs ont découvert que le gène CYP17A1 y était surexprimé en comparaison avec les cellules ovariennes de femmes normales (Wickenheisser *et al.* 2005). Toujours dans cette étude, il a été démontré que la demi-vie de l'ARNm du gène CYP17A1 était 2 fois plus longue dans les cellules thécales de femmes SOPK *vs* celles des femmes normales, ce qui pourrait selon les auteurs contribuer à augmenter la production d'androgènes.

Outre l'expression protéique ou génique de la P450c17, des changements au niveau des cofacteurs cytochrome b5 et POR pourraient contribuer à expliquer l'hyperandrogénisme des

femmes SOPK. Dans ce présent projet, nous avons démontré que l'expression des gènes CYB5A ainsi que CYPOR était augmentée chez les cellules NCI-H295R traitées à 200 μ M d'oléate et à la Fsk durant 48 h. Pour cette partie du projet, nous avons procédé à du RT-PCR et non à des analyses protéiques par buvardage de type Western, puisque ces protéines n'étaient que très faiblement mises en évidence par cette technique dans notre modèle cellulaire. Même si à notre connaissance, il n'existe pas d'étude dans la littérature à propos des liens entre la lipotoxicité, l'hyperandrogénisme ainsi que l'expression des cofacteurs cytochrome b5 et POR, nous pouvons dire que les résultats obtenus pour cette partie du projet correspondent à ceux attendus, puisqu'il est connu qu'une augmentation de ces cofacteurs peuvent mener à une augmentation de la production d'androgènes, comme ce qui est vu chez les femmes SOPK. Par ailleurs, comme mentionné dans l'introduction, la production d'androgènes peut également être augmentée par la phosphorylation en sérine de la P450c17 (Zhang *et al.* 1995). Il aurait été intéressant d'évaluer cet aspect dans notre modèle de cellules NCI-H295R exposées à l'oléate afin d'avoir un portrait complet de l'expression de la protéine P450c17 et de ses activateurs. À ce sujet, notre laboratoire a avancé l'hypothèse que les AGNE pourraient être responsables de la phosphorylation en sérine de l'enzyme P450c17, causant une augmentation de la production d'androgènes chez les femmes SOPK (Baptiste *et al.* 2010).

Les résultats issus de mon projet de maîtrise démontrent également une diminution non significative de l'expression du gène HSD3B2, codant pour l'enzyme 3 β -HSD qui est responsable de la transformation de la pregnenolone en progestérone et du DHEA en androstènedione, dans les cellules NCI-H295R exposées à l'oléate et à la Fsk (Figure 24. 86,7% \pm 4,90% vs 100%. $P = 0,078$). Un autre groupe de recherche s'est intéressée à l'expression de ce même gène dans un modèle de rates exposées à du DHT durant 12 semaines afin de mimer l'environnement hyperandrogénique retrouvé chez les femmes SOPK. Les auteurs ont découvert que l'expression du gène codant pour la 3 β -HSD murine était diminuée dans les cellules isolées du cortex ovarien des rates DHT par rapport aux rates contrôle (Salilew-Wondim *et al.* 2015). Dans ce sens, il semble que des anomalies au niveau de l'expression de ce gène soit impliquées dans la pathogénèse du SOPK. De plus, des analyses au niveau protéique chez les NCI-H295R ont démontré que l'androstènedione peut

inhiber de manière compétitive la 3 β -HSD (Thomas *et al.* 2015). Ceci pourrait donc agir comme mécanisme de régulation afin de diminuer l'hyperproduction d'androgènes par les cellules surrénaliennes chez les femmes SOPK.

7.3 Effet de l'oléate sur la phosphorylation de ERK1/2

Pour évaluer si l'activation de la voie de ERK est affectée par le traitement de 48 h à l'oléate, des buvardages de type Western ont été faits à partir des extraits protéiques des NCI-H295R et des cellules surrénaliennes humaines. Nos résultats ont démontré que la phosphorylation de ERK1/2 était significativement diminuée chez les NCI-H295R traitées à l'oléate et à la Fsk en comparaison avec la condition Fsk. À cause de l'importante variabilité des données obtenues et du plus petit nombre d'échantillons analysés dans les cellules surrénaliennes humaines, nous n'avons pu transposer ce résultat significatif dans ce modèle, même après avoir séparé les donneurs d'organes selon leur âge (inférieur ou supérieur à 50 ans).

Il est intéressant de noter que la diminution de l'activation de ERK1/2 observée chez les NCI-H295R traitées à l'oléate a également été objectivée par notre laboratoire dans un modèle de cellules surrénaliennes bovines cultivée en présence de palmitate (Bellanger *et al.* 2012). Cette diminution de l'activation de ERK1/2 pourrait être expliquée notamment par la résistance à l'insuline induite par la lipotoxicité, selon les mécanismes décrits dans l'introduction à la section 1.5.2. Dans un même ordre d'idée, il est aussi connu que les cellules thécales des femmes SOPK ont une diminution de 50% de la protéine ERK1/2 activée en comparaison avec les femmes normales et que ceci serait corrélé avec la production de l'androgène DHEA, indépendamment de la présence d'insuline dans le milieu de culture (Nelson-Degrave *et al.* 2005). Par ailleurs, cette étude a également démontré que les cellules thécales en présence d'un inhibiteur de la voie de ERK, le PD98059, avaient des niveaux augmentés du gène CYP17A1 mesurés par RT-PCR. En somme, nos résultats quant à la phosphorylation de ERK1/2 chez les NCI-H295R reflètent ce qui a préalablement été décrit dans la littérature et tendent à confirmer l'implication de dérèglements au niveau de la signalisation de l'insuline dans l'hyperproduction d'androgènes chez les femmes SOPK.

CONCLUSION

Le SOPK est un trouble d'ordre endocrinien très présent chez les femmes en âge de procréer et qui est principalement caractérisé par la dysfonction ovarienne, le risque augmenté de développer un diabète de type 2 ou de la résistance à l'insuline, ainsi que par l'hyperandrogénisme. Les données publiées dans la littérature ont amené mon laboratoire à poser l'hypothèse que la lipotoxicité pourrait potentiellement expliquer les caractéristiques cliniques de ce syndrome. Dans ce sens, les objectifs des projets présentés dans ce mémoire étaient d'étudier l'impact de la lipotoxicité sur la stéroïdogénèse et sur l'activation des médiateurs de la signalisation de l'insuline dans les 2 principaux organes producteurs d'androgènes chez la femme, soit l'ovaire et la glande surrénale.

Pour le premier projet, des femmes en processus de FIV ont été recrutées et séparées en 2 groupes selon le niveau de lipides (AGNE + TG) contenu dans leur liquide folliculaire. Nous n'avons pas remarqué de différences statistiquement significatives quant aux mesures anthropométriques, aux caractéristiques cliniques ainsi qu'aux issues de fertilité entre les participantes ayant peu ($< 50^{\text{e}}$ percentile) vs beaucoup ($\geq 50^{\text{e}}$ percentile) de lipides dans leur liquide folliculaire. Par contre, il est important de mentionner que les femmes avec des gras folliculaires $\geq 50^{\text{e}}$ percentile étaient plus âgées et avaient un plus grand tour de taille. De plus, les femmes avec des taux élevés d'AGNE + TG dans leur environnement intra-ovarien avaient plus de testostérone et un ratio estradiol/progestérone augmenté dans leur liquide folliculaire. Par ailleurs, nous n'avons pas été en mesure de démontrer une différence significative entre les groupes quant à l'activation des PKC α , ϵ , δ , d'Akt, de JNK et de p38 suite à des expériences d'ubiquitination de type Western. Nous avons tout de même remarqué que chez les femmes avec beaucoup de lipides dans leur liquide folliculaire, l'expression de PKC α à la membrane semblait supérieure à celle chez les femmes avec peu d'AGNE+TG.

Quant au second projet, une lignée de cellules surrénaliennes humaines, les NCI-H295R, ont été mises en culture et simulées durant 48 h à la Fsk, en la présence ou en l'absence de 200 μM d'oléate. Nous avons constaté que les cellules cultivées dans un milieu lipotoxique

avaient une production de DHEA augmentée de 49,1% par rapport à celles non exposées. De plus, la phosphorylation de ERK était diminuée dans la condition expérimentale, tandis que nous n'avons pas pu démontrer de différence significative entre les groupes quant à l'expression de l'enzyme P450c17. Chez les NCI-H295R, nous avons aussi étudié l'expression génique par RT-PCR de gènes impliqués dans l'androgénèse chez les cellules exposées ou non à l'oléate et nous n'avons pas remarqué de différence significative concernant l'expression génique de CYP17A1 et de HSD3B2. De manière intéressante, l'expression des cofacteurs de la P450c17 était significativement augmentée chez les cellules stimulées à la Fsk et exposées à 200 μ M d'oléate.

Dans ce second volet de ma maîtrise, nous avons également répété ces expérimentations chez des cellules surrénaliennes en culture primaire que nous avons isolées à partir de glandes surrénales provenant de donneurs d'organes. Puisque la capacité de produire des androgènes diminue avec l'âge, nous avons séparé les individus selon s'ils avaient moins ou plus de 50 ans au moment de leur décès. Chez les gens de moins de 50 ans, la production de DHEA des cellules surrénaliennes exposées à la Fsk et à l'oléate était augmentée de manière presque significative par rapport aux cellules exposées à la Fsk seulement, et à un % d'augmentation similaire que dans les cellules NCI-H295R, tandis qu'il n'y avait pas de différence entre les groupes chez les cellules d'individus de plus de 50 ans. Concernant l'activation de la voie de ERK1/2 et l'expression protéique de la P450c17, nous n'avons pu démontrer de différence significative entre les cellules cultivées ou non dans un milieu lipotoxique, et ce même après avoir séparé les individus selon leur âge.

En somme, les résultats obtenus dans le cadre de ma maîtrise tendent à confirmer le rôle des lipides dans la production des hormones sexuelles provenant de l'ovaire et de la glande surrénale. Même si les mécanismes sous-jacents restent à être investigués davantage, ceux-ci pourraient inclure une suractivation des cofacteurs de la P450c17, le cytochrome b5 et POR, par les AGNE et leurs métabolites ou encore par leur capacité à altérer la signalisation de la voie d'ERK1/2.

PERSPECTIVES

Dans l'avenir, il est certain qu'il serait intéressant de recruter un plus grand nombre de femmes en processus de FIV afin d'augmenter la puissance de nos analyses statistiques. Cet aspect du projet serait facilité par le retour du remboursement des frais liés à la procréation assistée par la RAMQ. Il serait également pertinent de doser dans les échantillons récoltés les DAG et les céramides, 2 métabolites des AGNE, pour les comparer entre les 2 groupes de participantes et les corrélérer avec les résultats de dosages hormonaux obtenus, telle la testostérone, l'estradiol et la progestérone. Par ailleurs, compte tenu de la nécessité d'obtenir un grand nombre de cellules de la granulosa pour les expériences de séparation des fractions cellulaires et d'ubiquitination de type Western, nous aimerions aussi réaliser des expérimentations dans une lignée cellulaire de cellules de la granulosa, soit les KGN. Dans ce modèle, il serait intéressant d'étudier les effets de plusieurs concentrations d'AGNE + TG sur les paramètres suivants : l'expression de l'enzyme aromatasase, la phosphorylation en sérine de IRS-1 et l'expression d'autres isoformes des PKC.

Dans nos modèles de cellules surrénaliennes, nous voudrions analyser par immunoprécipitation et ubiquitination de type Western, la phosphorylation en sérine de la P450c17 ainsi que son activité enzymatique suite à un traitement à l'oléate, puisque celle-ci est connue pour augmenter l'activité de l'enzyme. Finalement, nous aimerions répéter les expérimentations faites chez les NCI-H295R dans notre modèle de cellules surrénaliennes humaines en culture primaire, comme l'étude de l'expression des cofacteurs de la P450c17, cytochrome b5 et POR, ainsi que de l'expression génique de CYP17A1 et de HSD3B2. Ceci permettrait de s'assurer que les résultats obtenus chez les NCI-H295R sont similaires aux données des cellules surrénaliennes que nous avons isolées, ce qui confirmerait que cette lignée cellulaire est adéquate pour étudier la stéroïdogénèse de la glande surrénale.

ANNEXE

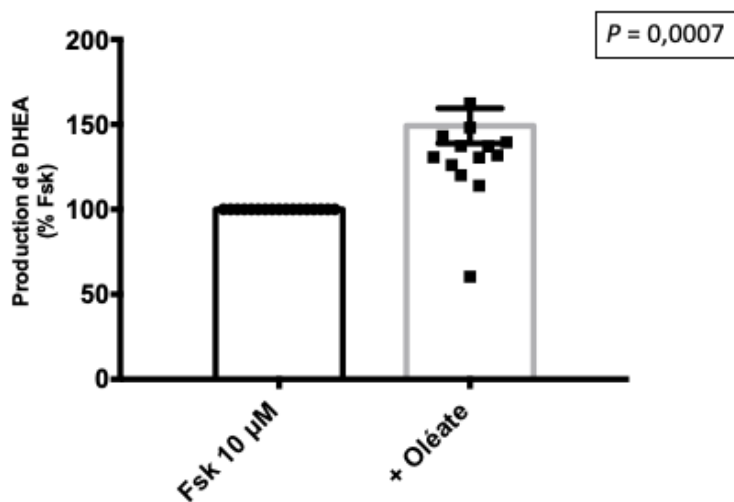


Figure 31 : Diagramme de points sur l'effet de 200 µM d'oléate sur la production de DHEA chez des cellules NCI-H295R traitées à la Fsk

Les cellules ont été stimulées durant 48 h à 10 µM de Fsk avec ou sans oléate. Le DHEA dans le milieu de culture a été dosé par ELISA et corrigé par la quantité de protéines. Les résultats de 17 expériences sont présentés en moyenne de % d'augmentation par rapport à la condition Fsk \pm SEM.

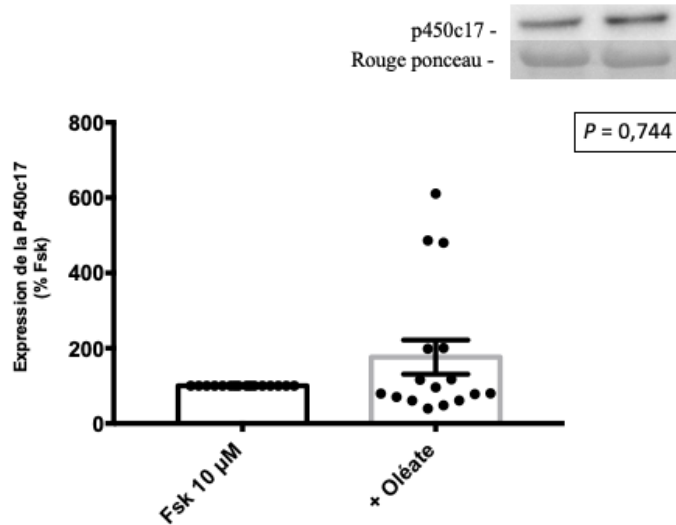


Figure 32 : Diagramme de points représentant l'effet de 200 μ M d'oléate sur l'expression de la P450c17 chez des cellules NCI-H295R traitées à la Fsk

Les cellules ont été stimulées durant 48 h à 10 μ M de Fsk avec ou sans oléate. L'expression de la P450c17 a été corrigée par la quantité de protéines totales sur la membrane d'ubiquitination de type Western obtenu par Ponceau S. Les résultats de 16 expériences sont présentés en moyenne de % d'augmentation par rapport à la condition Fsk \pm SEM.

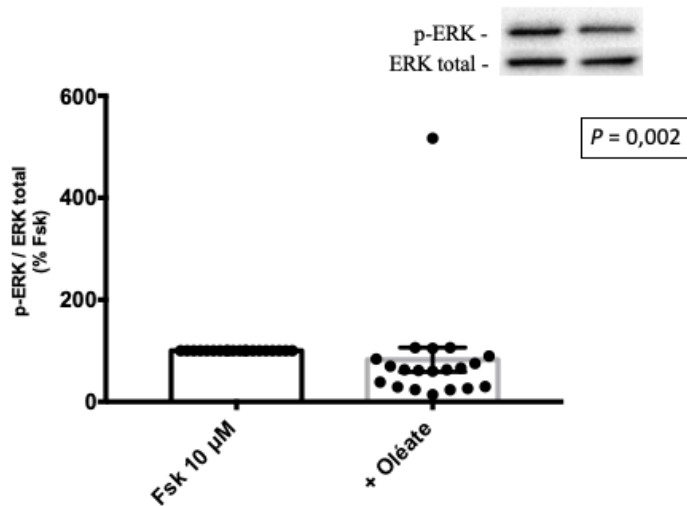


Figure 33 : Diagramme de points représentant l'effet de 200 μ M d'oléate sur la phosphorylation de ERK1/2 chez des cellules NCI-H295R traitées à la Fsk

Les cellules ont été stimulées durant 48 h à 10 μ M de Fsk avec ou sans oléate. La phosphorylation de ERK1/2 a été corrigée par l'expression de ERK1/2 total obtenu par ubiquitination de type Western. Les résultats de 20 expériences sont présentés en moyenne de % d'augmentation par rapport à la condition Fsk \pm SEM.

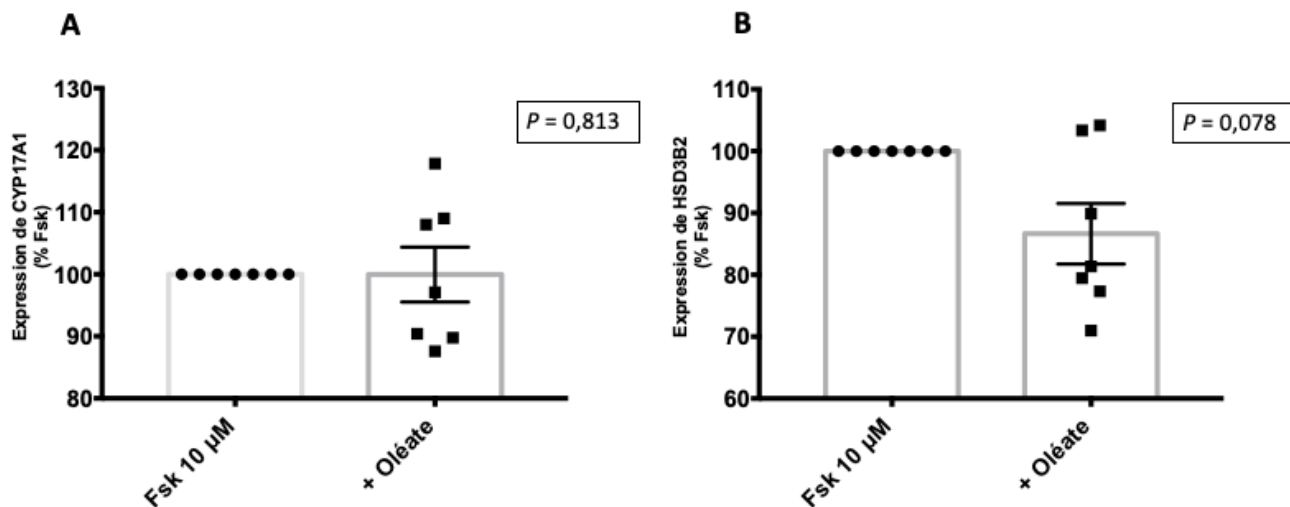


Figure 34 : Diagramme de points représentant l'effet de 200 μ M d'oléate sur la transcription de CYP17A1 et de HSD3B2 chez des cellules NCI-H295R traitées à la Fsk

Les cellules ont été stimulées durant 48 h à 10 μ M de Fsk avec ou sans oléate. L'ARNm a été extrait et du RT-PCR a été fait afin d'évaluer l'expression génique des gènes A) CYP17A1 et B) HSD3B2. Les résultats de 7 expériences sont présentés en moyenne de % d'augmentation par rapport à la condition Fsk \pm SEM.

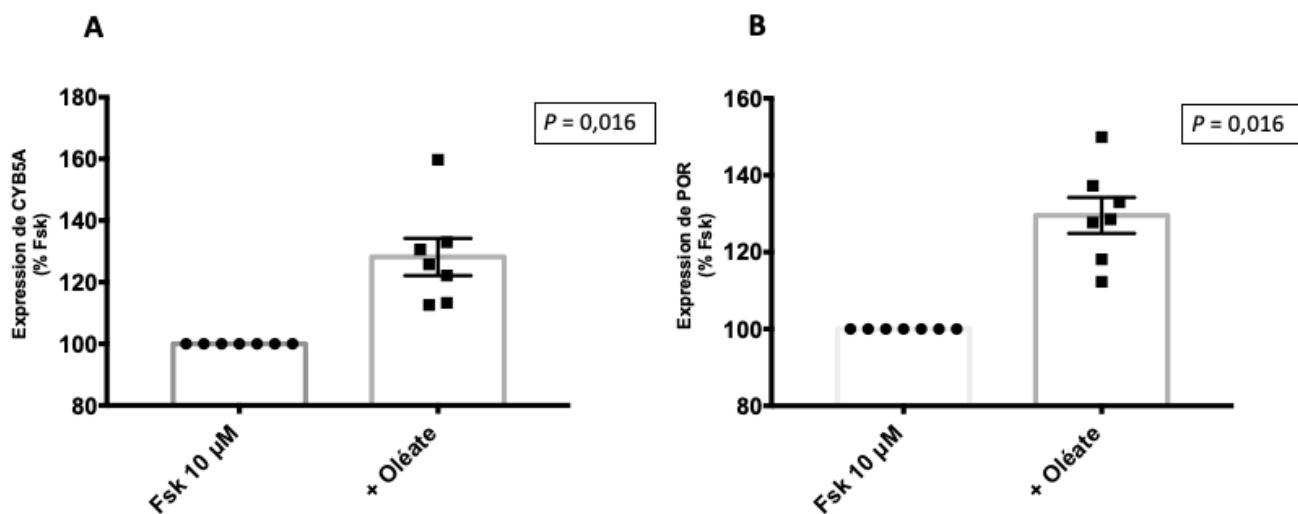
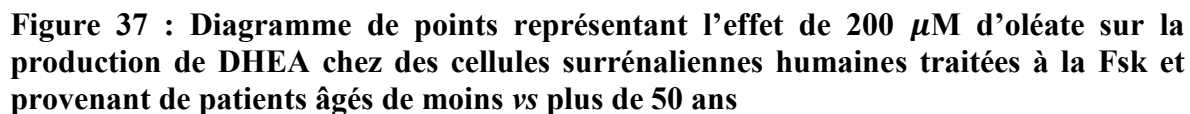


Figure 35 : Diagramme de points représentant l'effet de 200 μ M d'oléate sur la transcription de CYB5A et de POR chez des cellules NCI-H295R traitées à la Fsk

Les cellules ont été stimulées durant 48 h à 10 μ M de Fsk avec ou sans oléate. L'ARNm a été extrait et du RT-PCR a été fait afin d'évaluer l'expression génique des cofacteurs de la P450c17 A) CYB5A et B) CYPOR. Les résultats de 7 expériences sont présentés en moyenne de % d'augmentation par rapport à la condition Fsk \pm SEM.



Les cellules surrenaliennes issues d'une culture primaire ont été stimulées durant 48 h à 10 μ M de Fsk avec ou sans oléate. Le DHEA dans le milieu de culture a été dosé par ELISA et corrigé par la quantité de protéines. Les résultats de 14 glandes surrenales sont présentés en moyenne de % d'augmentation par rapport à la condition Fsk \pm SEM.



Les cellules surrénaliennes issues d'une culture primaire ont été stimulées durant 48 h à 10 μ M de Fsk avec ou sans oléate. Le DHEA dans le milieu de culture a été dosé par ELISA et corrigé par la quantité de protéines. Les résultats chez A) les individus de moins de 50 ans (n = 5) et B) les individus de plus de 50 ans (n = 8) sont présentés en moyenne de % d'augmentation par rapport à la condition Fsk \pm SEM.

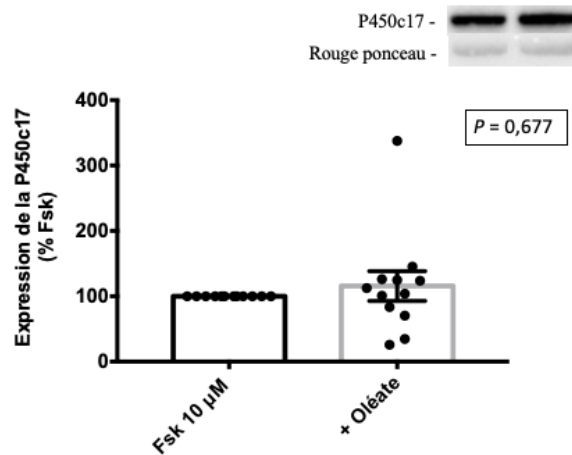


Figure 38 : Diagramme de points sur l' effet de 200 μ M d'oléate sur l'expression de la P450c17 chez des cellules surrénaliennes humaines traitées à la Fsk

Les cellules surrénaliennes issues d'une culture primaire ont été stimulées durant 48 h à 10 μ M de Fsk avec ou sans oléate. L'expression de la P450c17 a été corrigée par la quantité de protéines totales sur la membrane d'ubiquitination de type Western obtenu par Ponceau S. Les résultats de 12 glandes surrénales sont présentés en moyenne de % d'augmentation par rapport à la condition Fsk \pm SEM.

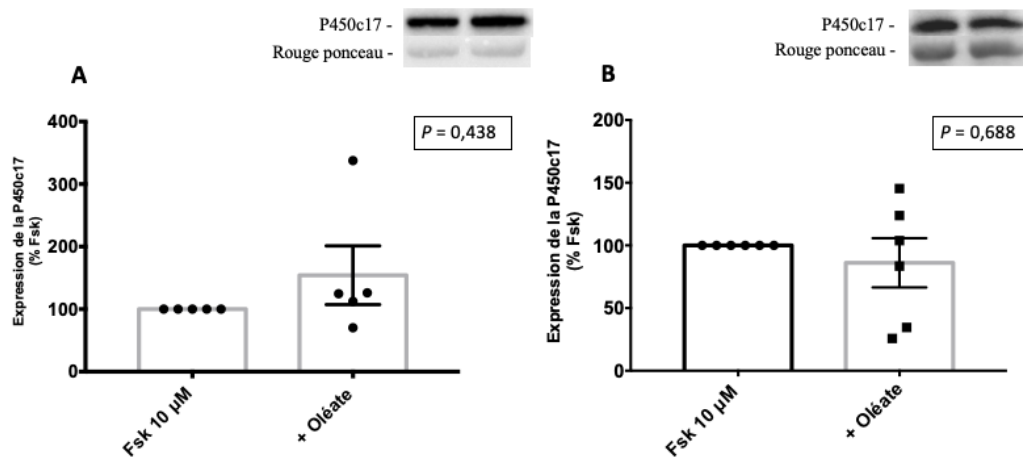


Figure 39 : Diagramme de points représentant l'effet de 200 μ M d'oléate sur l'expression de la P450c17 chez des cellules surrénaliennes humaines traitées à la Fsk et provenant de patients âgés de moins vs plus de 50 ans

Les cellules surrénaliennes issues d'une culture primaire ont été stimulées durant 48 h à 10 μ M de Fsk avec ou sans oléate. L'expression de la P450c17 a été corrigée par la quantité de protéines totales sur la membrane d'ubiquitination de type Western obtenu par Ponceau S. Les résultats chez A) les individus de moins de 50 ans (n = 5) et B) les individus de plus de 50 ans (n = 6) sont présentés en moyenne de % d'augmentation par rapport à la condition Fsk \pm SEM.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Al-Jefout, Moamar, Nedal Alnawaiseh, and Aiman Al-Qtaitat. 2017. "Insulin Resistance and Obesity among Infertile Women with Different Polycystic Ovary Syndrome Phenotypes." *Scientific Reports* 7 (1): 5339. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05717-y>.
- Andersen, C Y. 1993. "Characteristics of Human Follicular Fluid Associated with Successful Conception after in Vitro Fertilization." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 77 (5): 1227–34. <https://doi.org/10.1210/jcem.77.5.7521343>.
- Artini, P. G., C. Tatone, S. Sperduti, M. D'Aurora, S. Franchi, G. Di Emidio, R. Ciriminna, et al. 2017. "Cumulus Cells Surrounding Oocytes with High Developmental Competence Exhibit Down-Regulation of Phosphoinositol 1, 3 Kinase/Protein Kinase B (PI3K/AKT) Signalling Genes Involved in Proliferation and Survival." *Human Reproduction* 32 (12): 2474–84. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex320>.
- Azziz, Ricardo, Enrico Carmina, Didier Dewailly, Evanthia Diamanti-Kandarakis, Héctor F. Escobar-Morreale, Walter Futterweit, Onno E. Janssen, et al. 2009. *The Androgen Excess and PCOS Society Criteria for the Polycystic Ovary Syndrome: The Complete Task Force Report. Fertility and Sterility*. Vol. 91. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.06.035>.
- Baillargeon, Jean Patrice, Daniela J. Jakubowicz, Maria J. Iuorno, Salomon Jakubowicz, and John E. Nestler. 2004. "Effects of Metformin and Rosiglitazone, Alone and in Combination, in Nonobese Women with Polycystic Ovary Syndrome and Normal Indices of Insulin Sensitivity." *Fertility and Sterility* 82 (4): 893–902. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.02.127>.
- Baptiste, Catherine G., Marie Claude Battista, Andréanne Trottier, and Jean Patrice Baillargeon. 2010. "Insulin and Hyperandrogenism in Women with Polycystic Ovary Syndrome." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 122 (1–3): 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.12.010>.
- Barbour, Linda A., Carrie E. McCurdy, Teri L. Hernandez, John P. Kirwan, Patrick M. Catalano, and Jacob E. Friedman. 2007. "Cellular Mechanisms for Insulin Resistance in Normal Pregnancy and Gestational Diabetes." *Diabetes Care* 30 (SUPPL. 2). <https://doi.org/10.2337/dc07-s202>.
- Baulieu, Etienne-Emile, Guy Thomas, Sylvie Legrain, Najiba Lahlou, Marc Roger, Brigitte Debuire, Veronique Faucounau, et al. 2000. "Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA Sulfate, and Aging: Contribution of the DHEAge Study to a Sociobiomedical Issue." *Obstetrical & Gynecological Survey* 55 (11): 695–96. <https://doi.org/10.1097/00006254-200011000-00018>.
- Bednarska, Sylwia, and Agnieszka Siejka B-F. 2017. "Address for Correspondence Funding Sources None Declared The Pathogenesis and Treatment of Polycystic Ovary Syndrome: What's New?" *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 26 (2): 359–67. <https://doi.org/10.17219/acem/59380>.
- Bellanger, Sylvain, Marie Claude Battista, Guy D. Fink, and Jean Patrice Baillargeon.

2012. "Saturated Fatty Acid Exposure Induces Androgen Overproduction in Bovine Adrenal Cells." *Steroids* 77 (4): 347–53.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.12.017>.
- Ben-Haroush, Avi, Yariv Yogeve, and Benjamin Fisch. 2004. "Insulin Resistance and Metformin in Polycystic Ovary Syndrome." *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 115 (2): 125–33.
<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2003.11.027>.
- Ben-Rafael, Zion, Frank Meloni, Jerome F. Strauss, Luis Blasco, Luigi Mastroianni, and George L. Flickinger. 1987. "Relationships between Polypronuclear Fertilization and Follicular Fluid Hormones in Gonadotropin-Treated Women." *Fertility and Sterility* 47 (2): 284–88. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)50007-7](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)50007-7).
- Carpentier, André C. 2008. "Postprandial Fatty Acid Metabolism in the Development of Lipotoxicity and Type 2 Diabetes." *Diabetes and Metabolism* 34 (2): 97–107.
<https://doi.org/10.1016/j.diabet.2007.10.009>.
- Carpentier, André C, Frédérique Frisch, Denis Cyr, Philippe Gagnéux, Bruce W Patterson, Robert Giguère, and Jean-Patrice Baillargeon. 2005. "On the Suppression of Plasma Nonesterified Fatty Acids by Insulin during Enhanced Intravascular Lipolysis in Humans." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 289 (5): E849–56. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00073.2005>.
- Cazzolli, Rosanna, Lee Carpenter, Trevor J Biden, and Carsten Schmitz-Peiffer. 2001. "A Role for Protein Phosphatase 2A-Like Activity, but Not Atypical Protein Kinase C ζ , in the Inhibition of Protein Kinase B/Akt and Glycogen Synthesis by Palmitate." *Diabetes* 50 (10): 2210–18. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.10.2210>.
- Cedars, M I, K A Steingold, D de Ziegler, P S Lapolt, R J Chang, and H L Judd. 1992. "Long-Term Administration of Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist and Dexamethasone: Assessment of the Adrenal Role in Ovarian Dysfunction." *Fertility and Sterility* 57 (3): 495–500. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)54890-0](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)54890-0).
- Comin, A., D. Gerin, A. Cappa, V. Marchi, R. Renaville, M. Motta, U. Fazzini, and A. Prandi. 2002. "The Effect of an Acute Energy Deficit on the Hormone Profile of Dominant Follicles in Dairy Cows." *Theriogenology* 58 (5): 899–910.
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00922-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00922-6).
- Corbould, Anne, Young Bum Kim, Jack F. Youngren, Celia Pender, Barbara B. Kahn, Anna Lee, and Andrea Dunaif. 2005. "Insulin Resistance in the Skeletal Muscle of Women with PCOS Involves Intrinsic and Acquired Defects in Insulin Signaling." *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 288 (5 51-5): E1047–54. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00361.2004>.
- Costa, L.O.B., M.C. Mendes, R.A. Ferriani, M.D. Moura, R.M. Reis, and M.F. Silva de Sá. 2004. "Estradiol and Testosterone Concentrations in Follicular Fluid as Criteria to Discriminate between Mature and Immature Oocytes." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37 (11): 1747–55. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004001100021>.
- DeFronzo, R. A. 2004. "Dysfunctional Fat Cells, Lipotoxicity and Type 2 Diabetes." In *International Journal of Clinical Practice, Supplement*, 9–21. *Int J Clin Pract Suppl*.
<https://doi.org/10.1111/j.1368-504x.2004.00389.x>.
- Diamanti-Kandarakis, E. 2007. "Role of Obesity and Adiposity in Polycystic Ovary Syndrome." *International Journal of Obesity* 31 (S2): S8–13.

- <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803730>.
- Dresner, Alan, Didier Laurent, Melissa Marcucci, Margaret E. Griffin, Sylvie Dufour, Gary W. Cline, Lori A. Slezak, et al. 1999. "Effects of Free Fatty Acids on Glucose Transport and IRS-1-Associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity." *Journal of Clinical Investigation* 103 (2): 253–59. <https://doi.org/10.1172/JCI5001>.
- Engin, Ayse Basak. 2017. "What Is Lipotoxicity?" In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 960:197–220. Adv Exp Med Biol. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_8.
- Escobar-Morreale, Héctor F. 2018. "Polycystic Ovary Syndrome: Definition, Aetiology, Diagnosis and Treatment." *Nature Reviews Endocrinology* 14 (5): 270–84. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2018.24>.
- Eyvaznejad, Elham, Mohammad Nouri, Aliyeh Ghasemzadeh, Amir Mehdizadeh, Vahideh Shahnazi, Samira Asghari, Alireza Mardomi, and Masoud Darabi. 2018. "Steroid-Depleted Polycystic Ovarian Syndrome Serum Promotes in Vitro Oocyte Maturation and Embryo Development." *Gynecological Endocrinology* 34 (8): 698–703. <https://doi.org/10.1080/09513590.2018.1431770>.
- Frayn, K N. 1998. "Non-Esterified Fatty Acid Metabolism and Postprandial Lipaemia." *Atherosclerosis* 141 Suppl 1 (December): S41-6. [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(98\)00216-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(98)00216-0).
- Gallo-Payet, Nicole. 2016. "60 YEARS OF POMC: Adrenal and Extra-Adrenal Functions of ACTH." *Journal of Molecular Endocrinology* 56 (4): T135-56. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0257>.
- Gallo-Payet, Nicole, and Marie-Claude Battista. 2014. "Steroidogenesis-Adrenal Cell Signal Transduction." *Comprehensive Physiology* 4 (3): 889–964. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130050>.
- Gazdar, Adi F., Herbert K. Oie, Cedric H. Shackleton, T. R. Chen, Timothy J. Triche, Charles E. Myers, George P. Chrousos, Murray F. Brennan, C. A. Stein, and Renato V. La Rocca. 1990. "Establishment and Characterization of a Human Adrenocortical Carcinoma Cell Line That Expresses Multiple Pathways of Steroid Biosynthesis." *Cancer Research* 50 (17): 5488–96.
- Gervais, A., M. C. Battista, B. Carranza-Mamane, H. B. Lavoie, and J. P. Baillargeon. 2015. "Follicular Fluid Concentrations of Lipids and Their Metabolites Are Associated with Intraovarian Gonadotropin-Stimulated Androgen Production in Women Undergoing in Vitro Fertilization." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 100 (5): 1845–54. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-3649>.
- Giordano, S J, A Kaftory, and A W Steggles. 1994. "A Splicing Mutation in the Cytochrome B5 Gene from a Patient with Congenital Methemoglobinemia and Pseudohermaphroditism." *Human Genetics* 93 (5): 568–70. <https://doi.org/10.1007/BF00202825>.
- Girard, Jean. 2003. "Rôle Des Acides Gras Libres Dans La Sécrétion et l'action de l'insuline: Mécanismes de La Lipotoxicité." *Medecine/Sciences*. <https://doi.org/10.1051/medsci/20031989827>.
- Griffin, M E, M J Marcucci, G W Cline, K Bell, N Barucci, D Lee, L J Goodyear, E W Kraegen, M F White, and G I Shulman. 1999. "Free Fatty Acid-Induced Insulin Resistance Is Associated with Activation of Protein Kinase C Theta and Alterations in the Insulin Signaling Cascade." *Diabetes* 48 (6): 1270–74.

- <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.6.1270>.
- Gromadzka-Ostrowska, Joanna. 2006. "Effects of Dietary Fat on Androgen Secretion and Metabolism." *Reproductive Biology* 6 Suppl 2 (April): 13–20.
- Hannon, Patrick R., and Jodi A. Flaws. 2015. "The Effects of Phthalates on the Ovary." *Frontiers in Endocrinology* 6 (FEB): 1–19. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00008>.
- Haruta, T, T Uno, J Kawahara, A Takano, K Egawa, P M Sharma, J M Olefsky, and M Kobayashi. 2000. "A Rapamycin-Sensitive Pathway down-Regulates Insulin Signaling via Phosphorylation and Proteasomal Degradation of Insulin Receptor Substrate-1." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 14 (6): 783–94. <https://doi.org/10.1210/mend.14.6.0446>.
- Henninger, A. M. Josefin, Björn Eliasson, Lachmi E Jenndahl, and Ann Hammarstedt. 2014. "Adipocyte Hypertrophy, Inflammation and Fibrosis Characterize Subcutaneous Adipose Tissue of Healthy, Non-Obese Subjects Predisposed to Type 2 Diabetes." *PLoS ONE* 9 (8): e105262. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105262>.
- Hirabara, Sandro M., Renata Gorjão, Marco A. Vinolo, Alice C. Rodrigues, Renato T. Nachbar, and Rui Curi. 2012. "Molecular Targets Related to Inflammation and Insulin Resistance and Potential Interventions." *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012 (September). <https://doi.org/10.1155/2012/379024>.
- Højlund, Kurt, Dorte Grintborg, Nicoline R Andersen, Jesper B Birk, Jonas T Treebak, Christian Frøsig, Henning Beck-Nielsen, and Jørgen F.P. Wojtaszewski. 2008. "Impaired Insulin-Stimulated Phosphorylation of Akt and AS160 in Skeletal Muscle of Women with Polycystic Ovary Syndrome Is Reversed by Pioglitazone Treatment." *Diabetes* 57 (2): 357–66. <https://doi.org/10.2337/db07-0706>.
- Hotamisligil, G S, P Peraldi, A Budavari, R Ellis, M F White, and B M Spiegelman. 1996. "IRS-1-Mediated Inhibition of Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity in TNF-Alpha- and Obesity-Induced Insulin Resistance." *Science (New York, N.Y.)* 271 (5249): 665–68. <https://doi.org/10.1126/science.271.5249.665>.
- Ishimura, K, and H Fujita. 1997. "Light and Electron Microscopic Immunohistochemistry of the Localization of Adrenal Steroidogenic Enzymes." *Microscopy Research and Technique* 36 (6): 445–53. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19970315\)36:6<445::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19970315)36:6<445::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H).
- Itani, Samar I., Neil B. Ruderman, Frank Schmieder, and Guenther Boden. 2002. "Lipid-Induced Insulin Resistance in Human Muscle Is Associated with Changes in Diacylglycerol, Protein Kinase C, and IκB-α." *Diabetes* 51 (7): 2005–11. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.7.2005>.
- Itani, Samar I, Qian Zhou, Walter J Pories, K. G. MacDonald, and G. L. Dohm. 2000. "Involvement of Protein Kinase C in Human Skeletal Muscle Insulin Resistance and Obesity." *Diabetes* 49 (8): 1353–58. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.8.1353>.
- Jungheim, Emily S., George A. MacOnes, Randall R. Odem, Bruce W. Patterson, Susan E. Lanzendorf, Valerie S. Ratts, and Kelle H. Moley. 2011. "Associations between Free Fatty Acids, Cumulus Oocyte Complex Morphology and Ovarian Function during in Vitro Fertilization." *Fertility and Sterility* 95 (6): 1970–74. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.01.154>.
- Kamata, Hideaki, Shi-Ichi Honda, Shin Maeda, Lufen Chang, Hajime Hirata, and Michael Karin. 2005. "Reactive Oxygen Species Promote TNFalpha-Induced Death and Sustained JNK Activation by Inhibiting MAP Kinase Phosphatases." *Cell* 120 (5):

- 649–61. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.041>.
- Kim, Francis, Matilda Pham, Ian Luttrell, Douglas D Bannerman, Joan Tupper, Joshua Thaler, Thomas R Hawn, Elaine W Raines, and Michael W Schwartz. 2007. “Toll-like Receptor-4 Mediates Vascular Inflammation and Insulin Resistance in Diet-Induced Obesity.” *Circulation Research* 100 (11): 1589–96. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.106.142851>.
- Koutsari, Christina, and Michael D Jensen. 2006. “Free Fatty Acid Metabolism in Human Obesity.” *Journal of Lipid Research*. J Lipid Res. <https://doi.org/10.1194/jlr.R600011-JLR200>.
- Laaksonen, D E, T A Lakka, H-M Lakka, K Nyysönen, T Rissanen, L K Niskanen, and J T Salonen. 2002. “Serum Fatty Acid Composition Predicts Development of Impaired Fasting Glycaemia and Diabetes in Middle-Aged Men.” *Diabetic Medicine : A Journal of the British Diabetic Association* 19 (6): 456–64. <https://doi.org/10.1046/j.1464-5491.2002.00707.x>.
- Law, B, and S Rossie. 1995. “The Dimeric and Catalytic Subunit Forms of Protein Phosphatase 2A from Rat Brain Are Stimulated by C2-Ceramide.” *Journal of Biological Chemistry* 270 (21): 12808–13. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.21.12808>.
- Leblanc, Samuel, Marie Claude Battista, Christophe Noll, Anders Hallberg, Nicole Gallo-Payet, André C. Carpentier, Donna F. Vine, and Jean Patrice Baillargeon. 2014. “Angiotensin II Type 2 Receptor Stimulation Improves Fatty Acid Ovarian Uptake and Hyperandrogenemia in an Obese Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome.” *Endocrinology* 155 (9): 3684–93. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1185>.
- Lee, Joo Y., and Daniel H. Hwang. 2006. “The Modulation of Inflammatory Gene Expression by Lipids: Mediation through Toll-like Receptors.” *Molecules and Cells*. The Korean Society for Molecular and Cellular Biology.
- Liu, Hui Yu, Qu Fan Collins, Yan Xiong, Fatiha Moukdar, Edgar G. Lupo, Zhenqi Liu, and Wenhong Cao. 2007. “Prolonged Treatment of Primary Hepatocytes with Oleate Induces Insulin Resistance through P38 Mitogen-Activated Protein Kinase.” *Journal of Biological Chemistry* 282 (19): 14205–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609701200>.
- Mai, K., T. Bobbert, V. Kullmann, J. Andres, H. Rochlitz, M. Osterhoff, M. O. Weickert, et al. 2006. “Free Fatty Acids Increase Androgen Precursors in Vivo.” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91 (4): 1501–7. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-2069>.
- Mai, K., T. Bobbert, F. Reinecke, J. Andres, C. Maser-Gluth, S. A. Wudy, M. Möhlig, et al. 2008. “Intravenous Lipid and Heparin Infusion-Induced Elevation in Free Fatty Acids and Triglycerides Modifies Circulating Androgen Levels in Women: A Randomized, Controlled Trial.” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93 (10): 3900–3906. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0714>.
- Maldonado, Luiz Guilherme Louzada, José Gonçalves Franco, Amanda Souza Setti, Assumpto Iaconelli, and Edson Borges. 2013. “Cost-Effectiveness Comparison between Pituitary down-Regulation with a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Short Regimen on Alternate Days and an Antagonist Protocol for Assisted Fertilization Treatments.” *Fertility and Sterility* 99 (6): 1615–22. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.01.095>.
- Marino, Joseph S, Terry D Hinds, Rachael A Potter, Eric Ondrus, Jeremy L Onion, Abigail

- Dowling, Thomas J McLoughlin, Edwin R Sanchez, and Jennifer W Hill. 2013. "Suppression of Protein Kinase C Theta Contributes to Enhanced Myogenesis In Vitro via IRS1 and ERK1/2 Phosphorylation." *BMC Cell Biology* 14 (1): 39. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-39>.
- Martínez-Bermejo, E., M. Luque-Ramírez, and H. F. Escobar-Morreale. 2007. "Obesity and the Polycystic Ovary Syndrome." *Minerva Endocrinologica* 32 (3): 129–40.
- McCartney, Christopher R., and John C. Marshall. 2016. "Polycystic Ovary Syndrome." *New England Journal of Medicine* 375 (1): 54–64. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1514916>.
- Miller, Walter L., and Meng Kian Tee. 2014. "The Post-Translational Regulation of 17,20 Lyase Activity." *Molecular and Cellular Endocrinology* 408: 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.09.010>.
- Moggetti, Paolo, Flavia Tosi, Cecilia Bonin, Daniela Di Sarra, Tom Fiers, Jean-Marc Kaufman, Vito Angelo Giagulli, et al. 2013. "Divergences in Insulin Resistance Between the Different Phenotypes of the Polycystic Ovary Syndrome." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 98 (4): E628–37. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3908>.
- Moussard, Christian. 2006. *Biochimie Structurale et Métabolique*. 3e edition. Bruxelles: De Boeck.
- Munir, Iqbal, Hui Wen Yen, David H Geller, Donna Torbati, Rebecca M Bierden, Stacy R Weitsman, Sanjay K Agarwal, and Denis A Magoffin. 2004. "Insulin Augmentation of 17 α -Hydroxylase Activity Is Mediated by Phosphatidyl Inositol 3-Kinase but Not Extracellular Signal-Regulated Kinase-1/ 2 in Human Ovarian Theca Cells." *Endocrinology* 145 (1): 175–83. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0329>.
- Nakamura, Yasuhiro, Yewei Xing, Xiao-Gang Hui, Yumi Kurotaki, Katsuhiko Ono, Tony Cohen, Hironobu Sasano, and William E Rainey. 2011. "Human Adrenal Cells That Express Both 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 (HSD3B2) and Cytochrome B5 (CYB5A) Contribute to Adrenal Androstenedione Production." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 123 (3–5): 122–26. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.12.001>.
- Nawaratne, Ranmali, Alexander Gray, Christina H Jørgensen, C Peter Downes, Kenneth Siddle, and Jaswinder K Sethi. 2006. "Regulation of Insulin Receptor Substrate 1 Pleckstrin Homology Domain by Protein Kinase C: Role of Serine 24 Phosphorylation." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 20 (8): 1838–52. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0536>.
- Nelson-Degrave, Velen L., Jessica K. Wickenheisser, Karen L. Hendricks, Tomoichiro Asano, Midori Fujishiro, Richard S. Legro, Scot R. Kimball, Jerome F. Strauss, and Jan M. McAllister. 2005. "Alterations in Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase and Extracellular Regulated Kinase Signaling in Theca Cells Contribute to Excessive Androgen Production in Polycystic Ovary Syndrome." *Molecular Endocrinology* 19 (2): 379–90. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0178>.
- Nie, Li, Shi-Yu Cai, Jian-Zhong Shao, and Jiong Chen. 2018. "Toll-Like Receptors, Associated Biological Roles, and Signaling Networks in Non-Mammals." *Frontiers in Immunology* 9 (July): 1523. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01523>.
- Niu, Zhihong, Nan Lin, Ruihuan Gu, Yijuan Sun, and Yun Feng. 2014. "Associations between Insulin Resistance, Free Fatty Acids, and Oocyte Quality in Polycystic Ovary

- Syndrome during in Vitro Fertilization.” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 99 (11): E2269–76. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-3942>.
- Pandey, Amit V, and Walter L Miller. 2005. “Regulation of 17,20 Lyase Activity by Cytochrome B5 and by Serine Phosphorylation of P450c17.” *The Journal of Biological Chemistry* 280 (14): 13265–71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414673200>.
- Pantasri, Tawiwan, Linda L. Wu, M. Louise Hull, Thomas R. Sullivan, Michael Barry, Robert J. Norman, and Rebecca L. Robker. 2015. “Distinct Localisation of Lipids in the Ovarian Follicular Environment.” *Reproduction, Fertility and Development* 27 (4): 593–601. <https://doi.org/10.1071/RD14321>.
- Rattanachaiyanont, Manee, Arthur Leader, and Marie Claude Léveillé. 1999. “Lack of Correlation between Oocyte-Corona-Cumulus Complex Morphology and Nuclear Maturity of Oocytes Collected in Stimulated Cycles for Intracytoplasmic Sperm Injection.” *Fertility and Sterility* 71 (5): 937–40. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00100-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00100-4).
- Revelli, Alberto, Luisa Delle Piane, Simona Casano, Emanuela Molinari, Marco Massobrio, and Paolo Rinaudo. 2009. “Follicular Fluid Content and Oocyte Quality: From Single Biochemical Markers to Metabolomics.” *Reproductive Biology and Endocrinology* 7: 1–13. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-40>.
- Rhodes, Christopher J. 2005. “Type 2 Diabetes - A Matter of Beta Cell Life and Death?” *Science* 307 (5708): 380–84. <https://doi.org/10.1126/science.1104345>.
- Rone, Malena B, Jinjiang Fan, and Vassilios Papadopoulos. 2009. “Cholesterol Transport in Steroid Biosynthesis: Role of Protein-Protein Interactions and Implications in Disease States.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1791 (7): 646–58. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.03.001>.
- Salilew-Wondim, Dessie, Qi Wang, Dawit Tesfaye, Karl Schellander, Michael Hoelker, Md Munir Hossain, and Benjamin K. Tsang. 2015. “Polycystic Ovarian Syndrome Is Accompanied by Repression of Gene Signatures Associated with Biosynthesis and Metabolism of Steroids, Cholesterol and Lipids.” *Journal of Ovarian Research* 8 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13048-015-0151-5>.
- Senn, Joseph J. 2006. “Toll-like Receptor-2 Is Essential for the Development of Palmitate-Induced Insulin Resistance in Myotubes.” *The Journal of Biological Chemistry* 281 (37): 26865–75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513304200>.
- Sewer, Marion B, and Michael R Waterman. 2003. “CAMP-Dependent Protein Kinase Enhances CYP17 Transcription via MKP-1 Activation in H295R Human Adrenocortical Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (10): 8106–11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210264200>.
- Souza, Danielle Kaiser De, Loise Pedrosa Salles, Ricardo Camargo, Laura Vanessa Mourão Gulart, Suellen Costa E Silva, Beatriz Dolabela De Lima, Fernando Araripe Gonçalves Torres, and Alzira Amélia Martins Rosa E Silva. 2018. “Effects of PI3K and FSH on Steroidogenesis, Viability and Embryo Development of the Cumulus-Oocyte Complex after in Vitro Culture.” *Zygote* 26 (1): 50–61. <https://doi.org/10.1017/S0967199417000703>.
- Spiga, Francesca, Eleanor J Waite, Ying Liu, Yvonne M Kershaw, Greti Aguilera, and Stafford L Lightman. 2011. “ACTH-Dependent Ultradian Rhythm of Corticosterone Secretion.” *Endocrinology* 152 (4): 1448–57. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1209>.
- Spitaler, Martin, and Doreen A Cantrell. 2004. “Protein Kinase C and Beyond.” *Nature*

- Immunology* 5 (8): 785–90. <https://doi.org/10.1038/ni1097>.
- Stein, Irving F., and Michael L. Leventhal. 1935. “Amenorrhea Associated with Bilateral Polycystic Ovaries.” *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 29 (2): 181–91. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(15\)30642-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(15)30642-6).
- Steinberg, Susan F. 2012. “Cardiac Actions of Protein Kinase C Isoforms.” *Physiology* 27 (3): 130–39. <https://doi.org/10.1152/physiol.00009.2012>.
- Stocco, D. M. 2000. “The Role of the StAR Protein in Steroidogenesis: Challenges for the Future.” *Journal of Endocrinology*. J Endocrinol. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1640247>.
- Street, C, R J.S. Howell, L Perry, S Al-Othman, and T Chard. 1989. “Inhibition of Binding of Gonadal Steroids to Serum Binding Proteins by Non-Esterified Fatty Acids: The Influence of Chain Length and Degree of Unsaturation.” *Acta Endocrinologica* 120 (2): 175–79. <https://doi.org/10.1530/acta.0.1200175>.
- Tarlatzis, B C, N Laufer, A H DeCherney, M L Polan, F P Haseltine, and H R Behrman. 1985. “Adenosine 3',5'-Monophosphate Levels in Human Follicular Fluid: Relationship to Oocyte Maturation and Achievement of Pregnancy after in Vitro Fertilization.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 60 (6): 1111–15. <https://doi.org/10.1210/jcem-60-6-1111>.
- Tepekoy, Filiz, Ismail Ustunel, and Gokhan Akkoyunlu. 2014. “Protein Kinase C Isoforms α , δ and ϵ Are Differentially Expressed in Mouse Ovaries at Different Stages of Postnatal Development.” *Journal of Ovarian Research* 7 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13048-014-0117-z>.
- Tesarik, J, and C Mendoza. 1997. “Direct Non-Genomic Effects of Follicular Steroids on Maturing Human Oocytes: Oestrogen versus Androgen Antagonism.” *Human Reproduction Update* 3 (2): 95–100. <https://doi.org/10.1093/humupd/3.2.95>.
- Thomas, James L., Maheshinie Rajapaksha, Vance L. Mack, Geneva A. DeMars, Joseph A. Majzoub, and Himangshu S. Bose. 2015. “Regulation of Human 3β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 by Adrenal Corticosteroids and Product-Feedback by Androstenedione in Human Adrenarche.” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 352 (1): 67–76. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.219550>.
- Uehara, S, T Naganuma, A Tsuiki, K Kyono, H Hoshiai, and M Suzuki. 1985. “Relationship Between Follicular Fluid Steroid Concentrations and in Vitro Fertilization.” *Obstetrics and Gynecology* 66 (1): 19–23.
- Usui, I, Y Takata, T Imamura, H Morioka, T Sasaoka, T Sawa, H Ishihara, M Ishiki, and M Kobayashi. 1997. “Fatty Acid Induced Insulin Resistance in Rat-1 Fibroblasts Overexpressing Human Insulin Receptors: Impaired Insulin-Stimulated Mitogen-Activated Protein Kinase Activity.” *Diabetologia* 40 (8): 894–901. <https://doi.org/10.1007/s001250050765>.
- Vanholder, T., J. L.M.R. Leroy, A. Van Soom, G. Opsomer, D. Maes, M. Coryn, and A. De Kruif. 2005. “Effect of Non-Esterified Fatty Acids on Bovine Granulosa Cell Steroidogenesis and Proliferation in Vitro.” *Animal Reproduction Science* 87 (1–2): 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.09.006>.
- Vermeulen, A. 1983. “Androgen Secretion after Age 50 in Both Sexes.” *Hormone Research* 18 (1–3): 37–42. <https://doi.org/10.1159/000179777>.
- Vettor, R, A M Lombardi, R Fabris, R Serra, C Pagano, C Macor, and G Federspil. 2000. “Substrate Competition and Insulin Action in Animal Models.” *International Journal*

- of Obesity* 24 (2): S22–24. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801271>.
- White, Bruce, John Harrison, and Lisa Mehlmann. 2019. *Endocrine and Reproductive Physiology*. 5th editio. St. Louis: Elsevier.
- Wickenheisser, Jessica K., Velen L. Nelson-DeGrave, and Jan M. McAllister. 2005. “Dysregulation of Cytochrome P450 17 α -Hydroxylase Messenger Ribonucleic Acid Stability in Theca Cells Isolated from Women with Polycystic Ovary Syndrome.” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90 (3): 1720–27. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1860>.
- Williams, Carmen J, and Gregory F Erickson. 2000. *Morphology and Physiology of the Ovary*. Endotext. MDText.com, Inc.
- Wolff, Michael von, Petra Stute, Markus Eisenhut, Ulrich Marti, Norman Bitterlich, and Nick A. Bersinger. 2017. “Serum and Follicular Fluid Testosterone Concentrations Do Not Correlate, Questioning the Impact of Androgen Supplementation on the Follicular Endocrine Milieu.” *Reproductive BioMedicine Online* 35 (5): 616–23. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.07.012>.
- Xu, Pei, Bao Yi Huang, Jia Hui Zhan, Man Ting Liu, Yang Fu, You Qiang Su, Qing Yuan Sun, Wei Hua Wang, Dun Jin Chen, and Jian Qiao Liu. 2019. “Insulin Reduces Reaction of Follicular Granulosa Cells to FSH Stimulation in Women with Obesity-Related Infertility during IVF.” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 104 (7): 2547–60. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-00686>.
- Yildiz, Bulent O., Eric S. Knochenhauer, and Ricardo Azziz. 2008. “Impact of Obesity on the Risk for Polycystic Ovary Syndrome.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93 (1): 162. <https://doi.org/10.1210/JC.2007-1834>.
- Yildiz, Bulent Okan, Gurkan Bozdog, Zuhall Yapici, Ibrahim Esinler, and Hakan Yarali. 2012. “Prevalence, Phenotype and Cardiometabolic Risk of Polycystic Ovary Syndrome under Different Diagnostic Criteria.” *Human Reproduction* 27 (10): 3067–73. <https://doi.org/10.1093/humrep/des232>.
- Zhang, L H, H Rodriguez, S Ohno, and W L Miller. 1995. “Serine Phosphorylation of Human P450c17 Increases 17,20-Lyase Activity: Implications for Adrenarche and the Polycystic Ovary Syndrome.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (23): 10619. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.23.10619>.